

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Lokalizace proteinových komponent ribozomů a jejich
prekurzorů v mitochondriích parazitického prvoka
*Trypanosoma brucei***

Bakalářská práce

Julie Dedková

Školitel: Mgr. Ondřej Gahura, Ph.D., Biologické centrum AV ČR
Školitel – specialista: MSc. Jonathan Wong

České Budějovice 2023

Bibliografický údaj práce

Dedková, J., 2023: Lokalizace proteinových komponent ribozomů a jejich prekurzorů v mitochondriích parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*. [Localization of protein components of ribosomes and their precursors in mitochondria of parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The bachelor thesis focuses on the biogenesis of the small mitoribosomal subunit of the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. The main goal was to select proteins that are contained in the matured subunit or its precursors and to prepare genetically modified cell lines that will express selected proteins with an epitope for immunodetection. The next plan was to localize the tagged proteins within the mitochondrion in order to find out which phase of the biogenesis of the small mitoribosomal subunit is in association with the mitochondrial inner membrane and which phase of biogenesis takes place freely in the mitochondrial matrix.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne

.....

Julie Dedková

Poděkování

Velké poděkování patří mému školiteli Mgr. Ondřeji Gahurovi, Ph.D., za jeho pomoc a vstřícné konzultace v průběhu výzkumu i při psaní této bakalářské práce. Děkuji také MSc. Jonathanu Wongovi, který mě provedl všemi metodami v experimentální části práce a který mi poskl výsledky doplňujícího experimentu nezbytného pro tuto bakalářskou práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému týmu Laboratoře funkční biologie protist za to, že mi byli vždy nápomocní, a své rodině za důvěru a velkou podporu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Parazitický prvek <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2. Mitochondrie.....	2
1.3. Mitochondriální ribozomy	3
1.4. Mitochondriální ribozomy <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.5. Biogeneze malé mitoribozomální podjednotky u <i>Trypanosoma brucei</i>	5
1.6. Assembly faktory	7
2. Cíle práce	8
3. Materiály a metody	9
3.1. Metody molekulární biologie a manipulace DNA.....	9
3.1.1. Polymerázová řetězová reakce	9
3.1.2. Elektroforetická analýza DNA	11
3.1.3. Izolace plazmidů z <i>Escherichia coli</i>	11
3.2. Kultivace a modifikace organismů	11
3.2.1. Transformace <i>Escherichia coli</i>	11
3.2.2. Kmeny a kultivace <i>Trypanosoma brucei</i>	12
3.2.3. Transfekce <i>Trypanosoma brucei</i>	12
3.3. Biochemické metody	13
3.3.1. Separace proteinů pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforézy	13
3.3.2. Přenos proteinů na membránu a imunodetekce	13
3.3.3. Příprava celobuněčných lyzátů <i>Trypanosoma brucei</i>	14
3.3.4. Subcelulární frakcionace	14
3.3.5. Izolace mitochondrií <i>Trypanosoma brucei</i> hypotonickou metodou.....	15
3.3.6. Submitochondriální frakcionace.....	15
4. Výsledky	17

4.1. Příprava DNA pro genetickou manipulaci <i>Trypanosoma brucei</i> za účelem V5-tagování mitoribozomálních proteinů a assembly faktorů.....	17
4.2. Vytvoření geneticky modifikovaných buněčných linií <i>Trypanosoma brucei</i> tagováním mitoribozomálních proteinů a jejich prekurzorů V5 tagem	18
4.3. Ověření exprese všech proteinů označených V5 tagem imunodetekcí.....	19
4.4. Submitochondriální lokalizace V5 tagovaných proteinů mitoribozomů a jejich prekurzorů.....	22
5. Diskuze	29
6. Závěr.....	33
7. Reference.....	34

Seznam zkratek

AAC	antiporter ATP a ADP (ATP/ADP carrier)
APRT	adenin fosforibosyltransferáza (adenin phosphoribosyltransferase)
ATP	adenosintrifosfát
CP	centrální protuberance
cV beta	komplex V podjednotka beta oxidativní fosforilace
FBS	fetální bovinné sérum
HRP	kořenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
Hsp70	protein tepelného šoku 70 (heat shock protein 70)
KREPA1	protein pro editaci kinetoplastidové RNA 1 (kinetoplastid RNA editing protein 1)
mRNA	mesengerová RNA
mt-mRNA	mitochondriální messengerová RNA
mt-rRNA	mitochondriální ribosomální RNA
mt-tRNA	mitochondriální transferová RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PPR	pentatrikopeptidová repetice (pentatricopeptide repeat)
RNAi	RNA interference
rRNA	ribosomální RNA
SCoAS	succinyl-koenzym A syntetáza
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	dodecylsulfát sodný polyakrylamidová gelová elektroforéza
tRNA	transferová RNA
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
VDAC	aniontové kanály závislé na napětí (voltage-dependent anion channel)

1. Úvod

1.1. Parazitický prvok *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je extracelulární parazitický prvok, spadající do superříše Discoba. Jedná se o jednobíčíkatý organizmus, který způsobuje u lidí spavou nemoc (Cayla et al. 2019). Moucha tse-tse (*Glossina sp.*), která se živí krví, byla na přelomu 19. a 20. století odhalena lékařem Davidem Bruceem jako přenašeč této nemoci (Cox 2004). Za spavou nemoc jsou zodpovědné poddruhy *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Druhý z nich je známý tím, že zapříčiňuje horší průběh onemocnění. Častější nákaza je však způsobena *T. b. gambiense*, a to z více než z 95 % (Kennedy 2013). Třetí poddruh *T. brucei brucei* není pro člověka infekční, což ale neplatí pro dobytek a koně. U skotu způsobují trypanozomy onemocnění zvané nagana, které výrazně snižuje jeho produkci, a způsobuje tak velké ekonomické problémy (WHO 2013).

Životní cyklus *T. brucei* se dělí na dvě hlavní stádia – savčí stádium a hmyzí stádium, jejichž názvy se odvíjejí od dvou hlavních hostitelů. Savčí stádium má dvě formy, slender, neboli „štíhlou“ formu, a stumpy, neboli „krátkou“ formu. Štíhlá forma se aktivně dělí oproti krátké formě, která je v klidovém stádiu (Krüger et al. 2018; Bruce et al. 1912). Krátká forma, jejíž funkce je opětovně infikovat mouchu tse-tse, narozdíl od štíhlé formy, nedisponuje tzv. antigenní variací, což je proces, při kterém organizmus mění antigeny na svém povrchu (Silvester et al. 2017; Mugnier et al. 2015; Cross 1975). Ve středním střevě mouchy tse-tse se savčí krátká forma mění na hmyzí formu, procyklické trypomastigoty. V okamžiku, kdy hmyzí stádia trypanozom opustí střevo, mění se na epimastigoty, které se dostanou do slinných žláz, kde se aktivně dělí a přeměňují se na metacyklickou formu. Přenos na savce je zprostředkován slinami nakažené mouchy tse-tse, po nákaze savce se hmyzí forma mění na krevní formu (Schuster et al. 2021). Díky antigenní variaci jsou krátké formy krevního stádia trypanozom schopny přežít i v tak nevlídném prostředí, jako je krev savců, kde se nacházejí v časném stádiu onemocnění (Checchi et al. 2008; Mugnier et al. 2015; Cross 1975). V pozdním stádiu se nákaza z krve šíří přes hemoencefalickou bariéru do mozku (Figarella 2021; Poltera et al. 1977). *T. brucei* byla v pozdní fázi onemocnění identifikována i v dalších rezervoárech, jako například v tukové tkáni, ve které byl prokázán celkově větší počet parazitů než v mozku. Jejich výskyt v tukové tkáni zatím nebyl zcela objasněn, některé výhody to pro parazity má, a sice méně efektivní imunitní odpověď hostitele, možnost rychlejšího růstu a možnost využívat lipidy jako podstatný zdroj uhlíku.

Tento fakt by také mohl odůvodnit, proč pacienti se spavou nemocí často trpí ztrátou hmotnosti (Trindade et al. 2016). Ukázalo se, že kůže je také jedno z prostředí, ve kterém je schopna trypanozoma přežívat, a dokonce se transformovat ze štíhlé na krátkou formu. Krev proto nemusí být zdaleka jediným zdrojem nákazy mouchy tse-tse, přičemž nákaza se může skrývat v kůži i u zcela bezpříznakových a asymptomatických pacientů (Capewell et al. 2016).

1.2. Mitochondrie

Mitochondrie jsou dvoumembránové organely, které jsou pro buňku nezbytné. Hrají důležitou roli při energetickém metabolismu, jelikož plní funkci buněčného dýchání pomocí struktur na jejich vnitřní membráně, čímž produkují velké množství adenosintrifosfátu (ATP). V matrix mitochondrií se mimo jiné odehrává β -oxidace mastných kyselin, kterou katalyzují mitochondriální enzymy, kromě toho se také mitochondrie účastní metabolismu kovů a jsou schopné upravovat celkové množství metabolitů a aminokyselin v buňkách (Roger et al. 2017). Mitochondrie vznikly endosymbiózou bakterie, jejíž nejbližší příbuzný je dnes α -proteobakterie, s progenitorovou buňkou z říše archea (Spang et al. 2015; Esposti 2014; Gray 2012). Na základě toho jsou dnes mitochondrie semiautonómni organely, které si zachovaly vlastní DNA, která je však obecně velmi redukována a obsahuje pouze několik genů, jež kódují především hydrofobní proteiny membránových komplexů důležitých při buněčném dýchání (Ott et al. 2016). Nejvíce mitochondriálních genů kódujících protein (více než 60 genů) bylo pozorováno u Jakobida, naopak nejméně (3 geny) u prvoků *Plasmodium* (Blanquart a Gascuel 2011; Strassert et al. 2016). Právě díky endosymbióze se mnoho mitochondriálních genů přesunulo do jaderného genomu a proteiny, které kódují, jsou syntetizovány cytosolickými ribozomy, teprve až poté jsou transportovány do mitochondrií. Zároveň se některé mitochondriální geny staly po endosymbióze nadbytečné, a proto byly z genomu nadobro vypuštěny (Ott et al. 2016; Vögtle et al. 2009; Abe et al. 2000).

T. brucei má v každé buňce pouze jednu mitochondrii (Tyler et al. 2001), ve které se nachází tzv. kinetoplast. Jedná se o jednu síť mitochondriálního genomu, složenou z propojených maxikruhů a minikruhů DNA, což je ve srovnání s ostatními eukaryotických organizmy neobyčejný jev. Minikruhy (~1 kb) kódují stovky molekul RNA, které poté kontrolují úpravy na transkriptu maxikruhů. Maxikruhy (~23 kb) se vyskytují v desítkách identických kopií, které kódují dvě mitochondriální ribozomální RNA (mt-rRNA) molekuly a osmnáct mitochondriálních proteinů (Jensen a Englund 2012; Fairlamb et al. 1978). U

trypanozom existují různé formy mitochondrií, které se přizpůsobují jednotlivým trypanozomálním stádiím. Typická mitochondrie u hmyzího stádia je plně aktivní, oproti tomu mitochondrie u krevního stádia je utlumená. Mitochondrie u krevní formy *T. brucei* nevyužívají jako hlavní zdroj syntézy ATP oxidativní fosforylaci, nýbrž glykolýzu. Proto také tato forma neobsahuje některé složky elektronového transportního řetězce. Když se trypanozoma přemění na hmyzí formu, stává se hlavním zdrojem ATP oxidativní fosforylace (Njogu et al. 1980). ATP syntáza se však objevuje ve všech fázích životního cyklu *T. brucei* (Brown et al. 2001).

1.3. Mitochondriální ribozomy

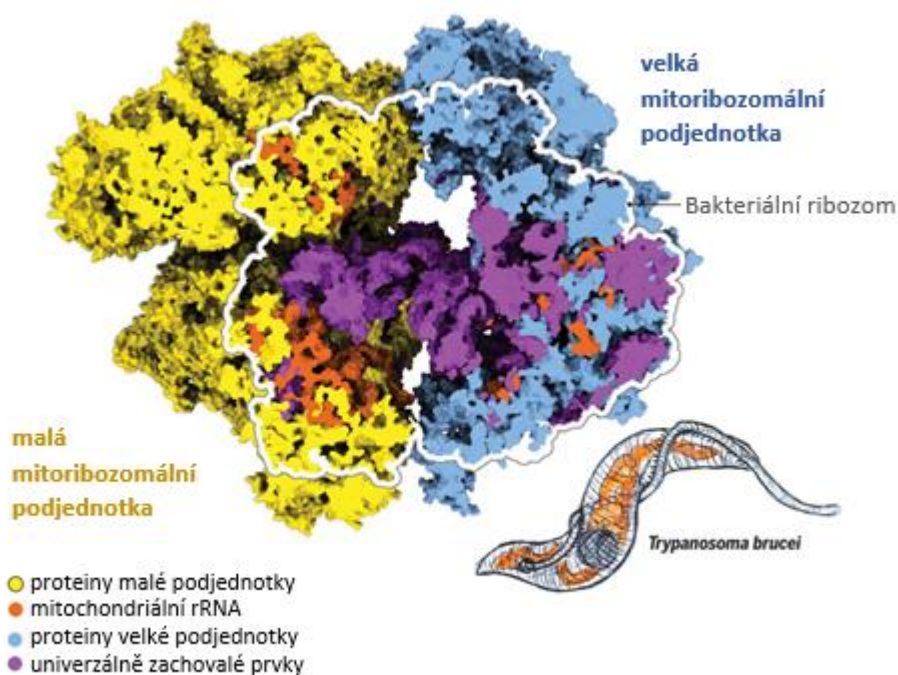
Mitochondrie mají také své ribozomy, nazvané mitochondriální ribozomy nebo též mitoribozomy. Mitoribozomy, stejně jako ribozomy v cytosolu, zprostředkovávají translaci neboli překlad mitochondriální messengerové RNA (mt-mRNA) na proteiny. Jsou složeny z malé a velké podjednotky a jejich struktura je tvořena molekulami mt-rRNA a mitoribozomálními proteiny (Greber a Ban 2016). Mitoribozomy se stihly od endosymbiotické události vedoucí ke vzniku eukaryot diverzifikovat a v dnešní době můžeme pozorovat mnoho odlišností mezi eukaryotickými mitoribozomy a bakteriálními ribozomy. Mitoribozomy mají obvykle výrazně zvýšené množství proteinů, které nahrazují mt-rRNA, a mají tak jakousi funkci výplně. Postupně se zjistilo, že tyto proteiny také výrazně rozšiřují funkční vlastnosti mitoribozomu (Sharma et al. 2003; Koc et al. 2001). U většiny eukaryotických organismů je mt-rRNA redukována s výjimkou, kterou je vnitřní jádro. Jedná se o vysoce konzervovanou strukturu, tvořenou mt-rRNA, která zůstala ustálená díky svým důležitým funkcím, jako je párování bází mezi kodonem mRNA a antikodonem transferové RNA (tRNA) v dekódovacím centru malé mitoribozomální podjednotky. Další důležitá funkce je syntéza peptidové vazby v peptidyl transferázovém centru velké podjednotky (Spahn et al. 2001; Ramrath et al. 2018).

Mitoribozomy jsou komplexní struktury, jejichž maturace je složitý proces zahrnující několik prekurzorů a velké množství proteinů, které napomáhají maturaci. Vyskytují se pouze u prekurzorů, nikoliv v maturovaných podjednotkách mitoribozomů. Takovéto proteiny jsou nazývány assembly faktory (Hilander et al. 2021).

1.4. Mitochondriální ribozomy *Trypanosoma brucei*

T. brucei je charakteristická svými mitoribozomy, které mají enormně zvýšené množství mitoribozomálních proteinů vytvářejících obal okolo vnitřního jádra. Jejich

struktura je složitější než u jiných eukaryotických organismů, které byly doposud popsány. Mitoribozom trypanozom má velikost okolo 4,5 MDa. mt-rRNA je zredukována pouze na dvě molekuly, oproti bakteriálním ribozomům, které mají dohromady celkem tři mt-rRNA molekuly (Ramrath et al. 2018; Brownlee a Sanger 1967). Jedna z dalších zajímavostí u *T. brucei* je poměr velikosti jednotlivých podjednotek. Jejich malá mitoribozomální podjednotka je totiž prostorově větší než podjednotka velká (viz obrázek č. 1) (Ramrath et al. 2018).



Obrázek č. 1: Porovnání velikosti mitoribozomu *T. brucei* a ribozomu bakterie (převzato a upraveno z Ramrath et al. 2018).

Pomocí kryo-elektronové mikroskopie byla vyřešena struktura malé i velké mitoribozomální podjednotky a také jejich prekurzorů. To přispělo k získání nových informací o trypanozomální translaci a také o maturaci mitoribozomů (Saurer et al. 2019; Jaskolowski et al. 2020, Soufari et al. 2020; Tobiasson et al. 2021). Trypanozomální mitoribozomy mají celou řadu struktur, jejichž architektura a v některých případech i funkce je odlišná jak od bakteriálních ribozomů, tak od ostatních eukaryotických mitoribozomů (Desai et al. 2017; Greber et al. 2015; Ramrath et al. 2018). Samotná architektura mitoribozomů má charakteristické rysy, například výstupní tunel, kterým odchází tvořící se protein z mitoribozomu. Tato struktura je proto běžně zachována bez větších změn (Ott et al. 2016), avšak u trypanozom je i tato struktura pozměněná. Výstupní tunel se větví a má dva

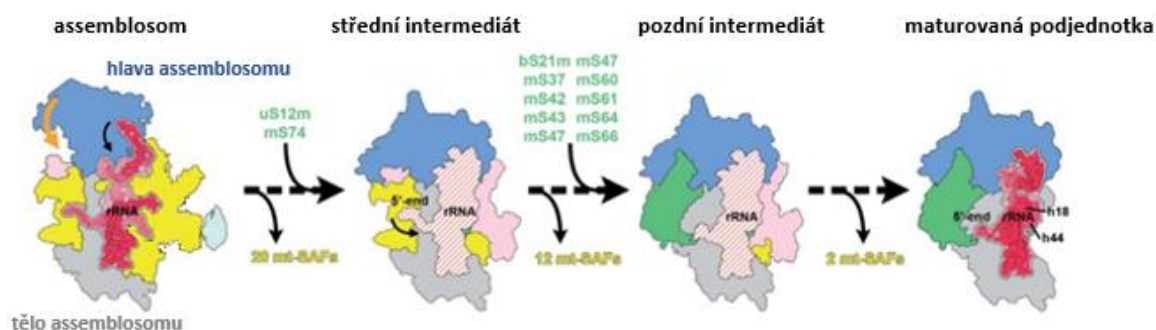
výstupy. Předpokládá se, že by takto rozdvojený výstup mohl být spojený s faktem, že tyto mitoribozomy syntetizují ve velkém proteiny tvořící membránové komplexy, které je potřeba již při translaci inzerovat do membrány. Ty by mohly opouštět mitoribozom jedním otvorem, zatímco nemembránové proteiny by mohly využívat alternativní otvor bez nutnosti odpojení mitoribozomu od vnitřní mitochondriální membrány (Ramrath et al. 2018). Další pozoruhodná část trypanozomálního mitoribozomu je tzv. centrální protuberance (CP), struktura velké mitoribozomální podjednotky, která představuje jedno z propojení mezi malou a velkou podjednotkou a mimo jiné také zajišťuje pohyby podjednotek při translaci. U bakteriálních ribozomů je CP tvořena 5S rRNA (Lotti et al. 1989), u savčích mitoribozomů se již 5S rRNA nevyskytuje a CP je tvořena mitochondriální tRNA (mt-tRNA) (Brown et al. 2014; Greber et al. 2014), kdežto u trypanozomálních mitoribozomů se jedná pouze o proteinovou strukturu (Ramrath et al. 2018).

1.5. Biogeneze malé mitoribozomální podjednotky u *Trypanosoma brucei*

Ribozomální podjednotky se vytvářejí každá zvlášť, až teprve po jejich maturaci se během iniciace translace a po rozeznání mt-mRNA podjednotky spojí v jeden funkční celek. Biogeneze mitoribozomů zatím nebyla objasněna na takové úrovni jako u cytosolických nebo bakteriálních ribozomů. Malá i velká ribozomální podjednotka jsou komplexní struktury, jejichž biogeneze a maturace prochází mnoha stádii, tzv. prekurzory. Prekurzory jsou tvořeny celou řadou assembly faktorů, proteinů, které jsou pro maturaci mitoribozomů nezbytné, jelikož mají specifické funkce, díky kterým napomáhají a katalyzují tvorbu maturované podjednotky. Jedná se o RNA helikázy, nukleázy, GTPázy, modifikující enzymy a chaperony, které napomáhají skládání mt-rRNA a jednotlivých mitoribozomálních proteinů. Některé z nich mají také funkci anti-asociační, kdy se váží na struktury, a ty následně svou vazbou inaktivují a zabraňují tak například předčasné translaci (Rozanska et al. 2017; Dennerlein et al. 2010; Valgardsdottir et al. 2004; Tu a Barrientos 2015; Lee et al. 2013; Jacob et al. 2013).

Doposud byly u trypanozomálních mitoribozomů zachyceny a strukturně popsány dva prekurzory velké podjednotky a tři prekurzory malé podjednotky (Saurer et al. 2019; Jaskolowski et al. 2020, Soufari et al. 2020; Tobiasson et al. 2021). První ze tří popsaných prekurzorů malé mitoribozomální podjednotky je tzv. assemblosom, který obsahuje celkem 34 assembly faktorů. Je to prekurzor nejméně podobný maturované podjednotce. Hlava assemblosomu obsahuje všechny proteiny, které jsou přítomny v maturované podjednotce, avšak při maturaci dochází k její rotaci. Tělo assemblosomu v této fázi ještě všechny

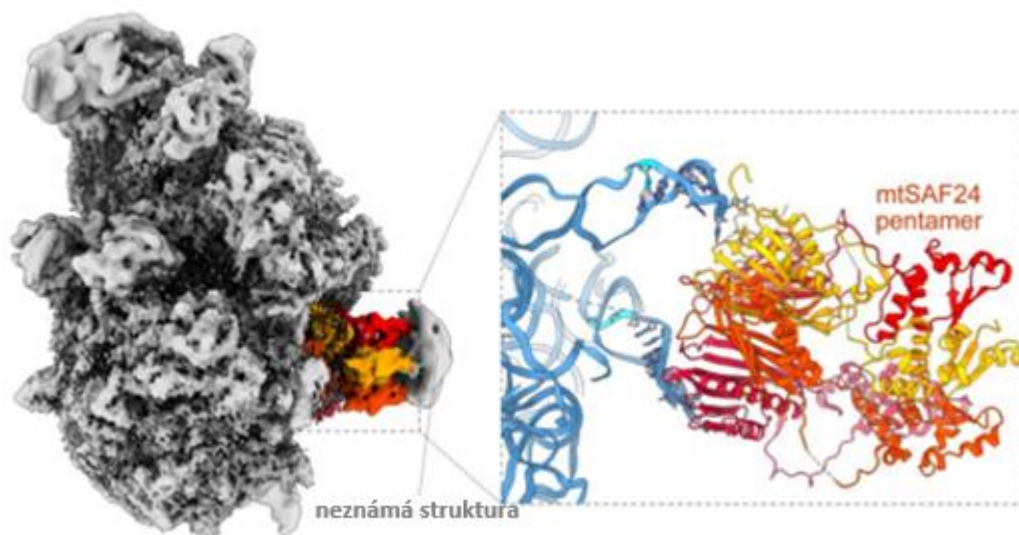
proteiny maturované podjednotky nezahrnuje, chybí mu celkem 12 mitoribozomálních proteinů, které se v průběhu maturace postupně připojí. Následuje prekurzor, zvaný střední intermediát, jehož hlava již prošla rotací (viz obrázek č. 2) a tělo přijalo dva nové mitoribozomální proteiny. Pozdní intermediát je poslední popsany prekurzor malé mitoribozomální podjednotky a zároveň je také nejvíc podobný zralé podjednotce. Tělo prekurzoru obsahuje pouze dva zbývající assembly faktory. Co se týká mt-rRNA, ta mění v průběhu maturace podjednotky svou konformaci, v prekurzorech je stabilizována v neaktivní formě pomocí některých assembly faktorů, a až když se assembly faktory z podjednotky uvolní, rRNA se postupně dostává do své maturované formy (Saurer et al. 2019).



Obrázek č. 2: Maturace malé mitoribozomální podjednotky *T. brucei* (převzato a upraveno ze Saurer et al. 2019).

Pomocí kryo-elektronové mikroskopie byla odhalena neznámá struktura, která je vázaná s assemblosomem mitoribozomu *T. brucei*. K neznámé struktuře se váže assembly faktor mt-SAF24, který je přítomný pouze v tomto prekurzoru a který vytváří výrazný výběžek (viz obrázek č. 3). Na základě tvaru, velikosti struktury a jejich detailů v mapě z kryo-elektronové mikroskopie (Saurer et al. 2019) je podle nás možné, že se jedná o fragment membrány. To formovalo naši hypotézu, která říká, že assemblosom je vázaný k vnitřní mitochondriální membráně prostřednictvím assembly faktoru mt-SAF24. A protože střední intermediát již neobsahuje zmíněný assembly faktor, můžeme předpokládat, že tento a následující intermediát již nejsou vázány k membráně a pravděpodobně se volně pohybují v matrix mitochondrií. Teprve až když je malá podjednotka maturovaná, je schopna se propojit s velkou maturovanou podjednotkou. Jak bylo ukázáno u jiných organismů (Pfeffer et al. 2015; Englmeier et al. 2017), velká mitoribozomální podjednotka je vázaná k membráně během translace a pravděpodobně po celou dobu její biogeneze, po spojení obou podjednotek se tak malá podjednotka automaticky stává také vázanou k vnitřní

mitochondriální membráně. Z toho vyplývá, že malá mitoribozomální podjednotka by se měla, narozdíl od velké mitoribozomální podjednotky, vázat k membráně pouze ve fázi assemblsomu a maturované podjednotky.



Obrázek č. 3: Assembly faktor mt-SAF24 vázaný k neznámé struktuře.

1.6. Assembly faktory

Mitoribozomální assembly faktory, které byly v této bakalářské práci modifikovány, jsou assembly faktory mt-SAF24 a mt-SAF16. Jedná se o proteiny, které se nacházejí pouze v assemblsomu a poté jsou z vyvíjející se podjednotky vypuštěny. mt-SAF24 je součástí těla malé podjednotky mitoribozomu a má pentamerickou strukturu. Část assembly faktoru mt-SAF24 udržuje mt-rRNA v neaktivní konformaci a je propojená s dalšími assembly faktory a proteiny malé mitoribozomální podjednotky. Svou další částí je mt-SAF24 vázaný k neznámé struktuře, která je dle naší hypotézy nejspíše vnitřní membrána mitochondrie. Součástí struktury, která odděluje hlavu assemblsomu od jeho těla, je assembly faktor mt-SAF16 (Saurer et al. 2019). V této bakalářské práci jsme také pracovali s linií, u níž jsme ovlivňovali expresi assembly faktoru mt-SAF18. Tento protein se nachází v centru assemblsomu a má mnohočetné kontakty s několika částmi mt-rRNA a s mnoha mitoribozomálními proteiny a assembly faktory. Naše nepublikovaná analýza (Zgadzday et al. – manuskript v přípravě) ukazuje, že se jedná o homolog RbfA, assembly faktoru účastnícího se biogeneze bakteriálních ribozomů (Schedlbauer et al. 2021) a savčích mitoribozomů (Itoh et al. 2022; Harper et al. 2023).

2. Cíle práce

- Připravit geneticky modifikované buněčné linie hmyzího stádia trypanozom, které exprimují vybrané proteiny mitochondriálního ribozomu nebo jeho prekurzorů s epitopem pro imunodetekci
- Ověřit mitochondriální lokalizaci takto modifikovaného proteinu pomocí subcelulární frakcionace
- Otestovat, zda prekurzory obsahující tyto značené proteiny asociují s vnitřní mitochondriální membránou pomocí submitochondriální frakcionace

3. Materiály a metody

3.1. Metody molekulární biologie a manipulace DNA

3.1.1. Polymerázová řetězová reakce

DNA pro tagování proteinových komponent byla amplifikována z části plazmidu pPOTv4 (Dean et al. 2015) se sekvencí pro GFP tag nahrazenou sekvencí pro V5 tag prostřednictvím metody polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR). Plazmid sloužil při PCR reakci jako templát a byly zde použity tzv. dlouhé primery (tabulka č. I).

Tabulka č. I: Sekvence primerů použitých při PCR metodě s kurzívou označenou 5'-koncovou částí pro homologní rekombinaci.

Kód primeru	Sekvence
AZ 1495	<i>AATTCTTCCTAGAGCAGGAGGAGTACATGACGTGGCTGGGA CAAGTACAGCATGTGGCAAATGCTGTATCGCGAACTGCAGG TTCTGGTAGTGGTTCC</i>
AZ 1496	<i>ATGTTTAGGCTGACATATGAGGAAACAAATCAATCCGTTACC AGAAACCCGCCAACACATTCGTCTGCATAATTTCTTCCCA ATTTGAGAGACCTGTGC</i>
AZ 1501	<i>CTTTATCGACGGTGGACCTCTGCCGTATGAAGGGTTCACCG GATGGTTATTATCACACCGAGGGCGCTGTGCACTTATCGGG TTCTGGTAGTGGTTCC</i>
AZ 1502	<i>ATATGAGTTTGTCCATCGGTCCCAGGCAATTCTTTCCACAAA TATATGGGAATGTGTGTACACGCACACAAAACCAACCA ATTTGAGAGACCTGTGC</i>
AZ 1348	<i>GACCAAGGAGGGAACCACTTAATGCAGCCGAGTCGATTCC ACCAAGAAACGAAAGGGCAGTTAATATTTGGACGGTGGACG GTTCTGGTAGTGGTTCC</i>
AZ 1349	<i>GCGCCTAAAATCGAGTTACCAACGGCATGAGGTATGGATGC AAACAAGCGCGATCGATACCCTTCAGTGACTTCCATCCACC AATTTGAGAGACCTGTGC</i>

Každý primer sestával ze dvou částí, tedy z 5' konce a 3' konce. 5' konec představoval homologní sekvenci k cílovému genu a jeho nepřekládané oblasti (untranslated region, UTR)

a byl tvořen 80 nukleotidy. Kratší 3' konec primeru byl komplementární k templátu a sloužil při PCR metodě jako počátek syntézy DNA (Dean et al. 2015). Použití jednotlivých primerů je uvedeno ve výsledcích. Kromě templátu a párů primerů byl pro tvorbu mastermixu potřeba kit AccuPrime™ Taq DNA Polymerase system, ze kterého byla použita AccuPrime™ Taq DNA polymeráza a reakční pufr 10× AccuPrime™ PCR pufr II. Množství jednotlivých komponent na 50 µl mastermixu jsou zapsána v tabulce č. II.

Tabulka č. II: Množství jednotlivých složek mastermixu.

Složka	Množství (µl)
10× reakční pufr	5
Forward primer (10 µM)	0,5
Reverse primer (10 µM)	0,5
Templát	0,3
AccuPrime™ Taq polymeráza	1,5
Deionizovaná voda	42,2

V termocykleru byly nastaveny jednotlivé fáze programu:

- Fáze č. 1 byla nastavena na 20 sekund při 94 °C, v této fázi probíhala denaturace
- Fáze č. 2 byla nastavena na 30 sekund při 65 °C, v této fázi probíhalo nasedání primerů
- Fáze č. 3 byla nastavena na 2,5 minuty při 68 °C, v této fázi probíhala extenze

Tyto tři fáze byly opakovány 30×. Dále byla v programu nastavena počáteční denaturace na 2 minuty při 94 °C. Tato fáze zahajovala celý program. Naopak terminální fáze celý program ukončila, jednalo se o 5 minut při 68 °C, kdy probíhala závěrečná extenze.

PCR produkt byl po reakci precipitován ethanolem. Do zkumavky byl přidán PCR produkt, 3 M NaOAc (pH 5,0) a 96% ethanol, a to vše v poměru 10:1:25. Po důkladném promíslení byl roztok inkubován přes noc při -20 °C. Poté byla suspenze centrifugována (15 000 rcf; 4 °C; 20 minut). Supernatant byl odstraněn, pelet byl resuspendován s 500 µl 70% ethanolu a suspenze byla centrifugována (15 000 rcf; 4 °C; 15 minut). Veškerý supernatant byl odstraněn, pelet byl vysušen a poté byl resuspendován s 21 µl deionizované

vody. Koncentrace PCR produktu byla změřena pomocí mikroobjemového spektrofotometru Nanodrop. Produkt byl poté uchován v lednici při 4 °C.

3.1.2. Elektroforetická analýza DNA

Byl vytvořen 1% agarózový gel s použitím agarózy od firmy Central European Biosystems a TAE pufru (40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 8,0; 20 mM kyselina octová). Do gelu byl posléze přidán ethidium bromid v poměru 1:500 při původní koncentraci 25,36 mM. Před nanesením na gel byl PCR produkt smísen s 10× směsí pro nanášení vzorků DNA na agarózový gel v poměru 1:10. Do jamek bylo nanášeno 5 µl vzorku a poté byla elektroforetická vana připojena ke zdroji na 100 V, 40 minut. Vizualizace vzorků byla provedena na přístroji ChemiDoc XRS+ System od firmy Bio-Rad.

3.1.3. Izolace plazmidů z *Escherichia coli*

Izolace plazmidů z bakterií *E. coli* byla provedena s použitím kitu GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit od výrobce Sigma-Aldrich podle přiloženého protokolu. Koncentrace izolované DNA ve vzniklém roztoku byla změřena pomocí mikroobjemového spektrofotometru Nanodrop. Izolovaná DNA byla uchovávána v mrazáku při -20 °C.

3.2. Kultivace a modifikace organismů

3.2.1. Transformace *Escherichia coli*

K 20-50 µl kompetentních buněk *E. coli* XL1 Blue bylo přidáno 20-50 µl (10 pg-100 ng) ligační směsi. Mix bakteriálních buněk a DNA byl inkubován na ledu 30 minut a poté byla zkumavka vložena do vodní lázně o 42 °C. Po 45 sekundách byla zkumavka vrácena zpátky na led na 2 minuty. Po uplynutí 2 minut byl do zkumavky přidán 1 ml S. O. C. média (0,5% výtažek z kvasinek; 2% trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O; 10 mM MgCl₂ × 6 H₂O; 20 mM glukóza), takto byly bakterie ponechány v třepaném inkubátoru při 37 °C 45 minut. Bakterie byly dále centrifugovány (4 000 rcf; 20 °C; 4 minuty), 300 µl supernatantu bylo odstraněno a poté, co byl pelet pečlivě resuspendován se zbylým supernatantem, bylo 100 µl této suspenze rozprostřeno na agarové plotny s antibiotikem ampicilinem (100 µg/ml). Agaróзовые plotny byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C přes noc. Vybraná kolonie byla před izolací plazmidů dále inkubovaná 24 hodin v LB médiu (1% trypton; 0,5% kvasinkový extrakt; 1% NaCl).

3.2.2. Kmeny a kultivace *Trypanosoma brucei*

V této bakalářské práci byla použita linie Lister Strain 472 hmyzího buněčného stádia *T. brucei*, s integrovaným konstruktem p-Sm-Ox (Poon et al. 2012) pro expresi tetracyklinového represoru a T7 polymerázy a dále od ní odvozené linie umožňující potlačení exprese genu mt-SAF16 nebo mt-SAF18 pomocí RNA interference (RNAi). Tyto linie byly dříve připraveny v naší laboratoři.

Všechny buněčné linie byly kultivovány v médiu SDM-79 od výrobce Gibco s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a s přidáním příslušnými antibiotiky podle genetických modifikací dané linie (puromycin 1,0 µg/ml; blasticidin 10 µg/ml; hygromycin 25 µg/ml; tetracyklin 5 µg/ml). Všechny linie byly kultivovány v inkubátoru při 27 °C.

3.2.3. Transfekce *Trypanosoma brucei*

Pro dvě transfekce hmyzího stádia *T. brucei* bylo použito 1×10^8 buněk v exponenciální fázi růstu. Tyto buňky byly centrifugovány (1300 rcf; 4 °C; 10 minut), supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt 10 ml studeného pufru CytoMix (25 mM Hepes, pH 7,6; 120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM pufr fosforečnanu draselného, pH 7,6; 2 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 6 mM glukóza). Buňky byly následně opět centrifugovány (1300 rcf; 4 °C; 10 minut) a po odstranění supernatantu byly resuspendovány v 1 ml studeného CytoMixu. Do kyvety byly přidány 4 µg PCR produktu a 0,5 ml buněčné suspenze a vše bylo důkladně promícháno. Byla provedena elektroporace přístrojem BTX ECM 630 při nastavení 1600 V, 25 Ω, 50 µF. Po elektroporaci byly buňky resuspendovány v 6 ml SDM-79 s příslušným antibiotikem (viz 3.2.2. Kmeny a kultivace *Trypanosoma brucei*). Po 16-18 hodinách bylo přidáno dalších 6 ml média SDM-79, které navíc obsahovalo selekční antibiotikum hygromycin o koncentraci 2× vyšší, než je běžné – 50 µg/ml. Po promíchání byla kultura zředěna na 24-jamkových destičkách následujícím způsobem: do každé jamky v první řadě byly přidány 2 ml připravené buněčné kultury. Do druhé a třetí řady bylo přidáno vždy 1,5 ml SDM-79 média s příslušnými antibiotiky. Ve čtvrté řadě byly jamky naplněny 1 ml SDM-79 média s příslušnými antibiotiky. Z první řady bylo přeneseno 0,5 ml kultury do druhé řady a vše bylo důkladně promícháno. Z druhé řady bylo přeneseno 0,5 ml kultury do řady třetí a z této řady bylo opět přeneseno 0,5 ml kultury do řady čtvrté. Tímto bylo zajištěno zředění buněk, konkrétně ve druhé řadě byly buňky ředěny 4×, ve třetí řadě 16×, ve čtvrté 48×. Buňky byly nadále selektovány pomocí specifického antibiotika hygromycinu.

3.3. Biochemické metody

3.3.1. Separace proteinů pomocí denaturační polyakrylamidové elektroforézy

Pro ověření přítomnosti tagovaných proteinů byla použita dodecylsulfát sodný polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE). Tato proteinová elektroforéza byla provedena s použitím dodecylsulfát sodného (SDS) polyakrylamidového gelu Novel™ Wedge Well™ 4-20% Tris-glycin gel značky Invitrogen a SDS-PAGE running pufru (25 mM Tris; 192 mM glycin; 3,5 mM SDS). Po nanesení vzorků (10-40 μ l) do jamek byla elektroforetická vana připojena ke zdroji na 110-150 V po dobu 1-1,5 hodiny.

3.3.2. Přenos proteinů na membránu a imunodetekce

Přenos proteinů z gelu na membránu byl proveden pomocí metody Western Blot. Blotovací „sendvič“ byl složen z blotovacích kazet, gelu, houby, hrubého filtračního papíru a blotovací membrány. Blotovací membrána byla před sestavením sendviče vložena na 1 minutu do methanolu a poté do přenosového pufru (48 mM Tris; 39 mM glycin; 20% methanol), filtrační papír a gel byly namočený pouze do přenosového pufru. Blotovací sendvič byl poté sestaven v následujícím pořadí: černá blotovací kazeta, houba, hrubý filtrační papír, gel, blotovací membrána, hrubý filtrační papír, houba, červená blotovací kazeta. Do vany na Western Blot byly vloženy složené blotovací sendviče, byla naplněna přenosovým pufrem a připojena ke zdroji na 90 minut při 90 V.

Membrána byla po Western blotu inkubovaná minimálně 1 hodinu v 5% roztoku sušeného odtučněného mléka, připraveného v PBS-T (5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 145 mM NaCl; 0,05% tween 20). Roztok mléka fungoval jako blokovací roztok. Po inkubaci v mléce se membrána inkubovala další hodinu v roztoku mléka a primární protilátky (příloha 1), následně byla membrána promyta 3 \times po 15 minutách v PBS-T pufru. Po promytí byla membrána inkubována 1 hodinu v roztoku sekundární protilátky od firmy Bio-Rad a mléka v poměru 1:2000 a byla promyta 3 \times po 15 minutách a 2 \times po 10 minutách v PBS-T pufru. Sekundární protilátka byla značena enzymem, zvaným kořenová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP). Po posledním promytí byl použit chemiluminiscenční kit Clarity Western ECL Substrate od firmy Bio-Rad a signály na membráně byly vzápětí vizualizovány v přístroji ChemiDoc XRS+ System od firmy Bio-Rad.

3.3.3. Příprava celobuněčných lyzátů *Trypanosoma brucei*

Pro přípravu celobuněčných lyzátů z hmyzího stádia *T. brucei* bylo odměřeno 1×10^7 buněk a ty byly centrifugovány (1300 rcf; 4 °C; 10 minut). Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován s 1 ml PBS-G (5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 145 mM NaCl; 6 mM glukózy). Po promíchání bylo PBS-G doplněno do objemu 1,5 ml a suspenze byla centrifugována (1300 rcf; 4 °C; 10 minut). Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován se 100 μl PBS (5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 145 mM NaCl) a 50 μl 3 \times barvivem SDS-PAGE (6% SDS; 300 mM dithiotreitol; 150 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30% glycerol; 0,02% bromfenolová modř). Suspenze byla ponechána 7 minut v termobloku při 97 °C. Připravené vzorky byly uskladněny v mrazáku při -20 °C, před SDS-PAGE elektroforézou byly znovu zahřáty v termobloku při 97 °C 7 minut, dále byl proveden Western blot a imunodetekce (viz 3.3. Biochemické metody).

3.3.4. Subcelulární frakcionace

Pro subcelulární frakcionaci na organelární a cytosolickou frakci bylo sklizeno a centrifugováno (1300 rcf; 4 °C; 10 minut) 1×10^8 buněk. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 5 ml PBS-G, poté bylo PBS-G doplněno do objemu 14 ml. Suspenze byla centrifugována (1300 rcf; 4 °C; 10 minut) a po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován s 1 ml PBS-G. Po resuspendaci bylo PBS-G doplněno do objemu 1,5 ml. Suspenze byla opět centrifugována (1300 rcf; 4 °C; 10 minut) a všechen supernatant byl pečlivě odstraněn. Pelet byl resuspendován s 500 μl SoTE (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 600 mM sorbitol; 2 mM EDTA, pH 8,0), do roztoku bylo dále přidáno 500 μl SoTE s 0,03% digitoninem (to bylo před přidáním zahříváno v mikrovlnné troubě). Celá zkumavka byla jednou převrácena a inkubována na ledu 5 minut. Po inkubaci bylo ze suspenze odebráno 100 μl , které představovaly input a byly smíseny s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, koncentrace buněk ve vzorku byla $6,7 \times 10^4$ buněk/ μl . Zbylá suspenze byla centrifugována (4600 rcf; 4 °C; 3 minuty). Všechen supernatant, který představoval cytosolickou frakci, byl přenesen do nové zkumavky a byl změřen jeho objem. Z cytosolické frakce (supernatantu) bylo odebráno 100 μl a to bylo smíseno s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, koncentrace buněk v tomto vzorku byla $6,7 \times 10^4$ buněk/ μl . Pelet, který představoval organelární frakci, byl resuspendován s PBS o stejném objemu, jako měl odebraný supernatant, a do 100 μl této organelární frakce bylo přidáno 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, koncentrace buněk ve vzorku byla $6,7 \times 10^4$ buněk/ μl . Organelární i cytosolická frakce byly zahřáty v termobloku při 97 °C

na 7 minut a poté byly uskladněny v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro subcelulární detekci vzorků byla provedena SDS-PAGE elektroforéza, před kterou se vzorky znovu vložily do termobloku při $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 7 minut. Dále byl proveden Western blot a imunodetekce (viz 3.3. Biochemické metody).

3.3.5. Izolace mitochondrií *Trypanosoma brucei* hypotonickou metodou

Pro submitochondriální frakcionaci na membránovou a matrix frakci bylo nejprve potřeba z buněk izolovat mitochondrie. Bylo odměřeno $3,5 \times 10^9$ buněk, které byly centrifugovány (1300 rcf; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 minut), supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 10 ml ledového NET pufru (150 mM NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Suspenze byla opět centrifugována (1300 rcf; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 minut) a po tom, co byl supernatant odstraněn, byl pelet dále resuspendován v 2,9 ml DTE (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA). Ihned po resuspendaci s DTE byly buňky lyzovány pomocí injekční stříkačky s jehlou (25G), suspenze byla 3× nasáta do stříkačky a ven. Po třetím opakování bylo do suspenze obratem přidáno 485 μl roztoku 60% sacharózy a vše bylo šetrně promícháno. Suspenze byla poté centrifugována (15000 rcf; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 minut), supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl resuspendován v 565 μl STM (250 mM sacharóza; 20 mM Tris, pH 8,0; 2 mM MgCl_2). Do suspenze bylo přidáno 1,7 μl MgCl_2 (1 M zásobní roztok), 1,7 μl CaCl_2 (0,1 M zásobní roztok) a 1 μl DNázy (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM dithiotreitol; 50% glycerol; 10 mg/ml DNáza I). Suspenze byla promíchána a byla inkubována 1 hodinu na ledu. Poté byla DNáza zastavena přidáním 565 μl ledového STE pufru (250 mM sacharóza; 20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA). Vzorek byl centrifugován (15000 rcf; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 minut) a po centrifugaci byl pelet, který představoval submitochondriální frakci, promyt 700 μl STE pufru. Před pokračováním experimentu mohla být submitochondriální frakce zmrazena vložím zkušavky do tekutého dusíku na 45 sekund a uchována v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.6. Submitochondriální frakcionace

Pro submitochondriální frakcionaci byl pelet důkladně resuspendován v pufru A (10 mM MgCl_2 připraven v deionizované vodě). Množství pufru A záleželo na přesném počtu buněk, ze kterých byly izolovány mitochondrie, přičemž platí, že na $1,5 \times 10^9$ buněk bylo použito 350 μl pufru. Po resuspendování bylo provedeno 10 cyklů zmrazení a rozmrazení vzorků, které zahrnovaly vložení vzorku na 45 sekund do tekutého dusíku, rozmrazení vzorku na pokojovou teplotu a jeho 1-minutovou inkubaci na ledu. Po

10 cyklech bylo odebráno 100 μl vzorku, který představoval input, a to bylo smícháno s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, výsledná koncentrace buněk ve vzorku byla $2,8 \times 10^6$ buněk/ μl (při původní koncentraci buněk $1,5 \times 10^9$). Zbývající suspenze byla centrifugována (6000 rcf; 4 °C; 5 minut). Do nové zkumavky byl přenesen všechen supernatant, který představoval rozpustnou frakci, která obsahuje zejména matrix mitochondrie a jeho objem byl změřen (objem 1). Supernatant byl znovu centrifugován (6000 rcf; 4 °C; 5 minut), aby byl očištěn od případného zbylého peletu. Bylo odebráno 100 μl supernatantu, který představoval frakci matrix, a to bylo smícháno s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, výsledná koncentrace buněk ve vzorku byla $2,6 \times 10^6$ buněk/ μl . Pelet, který představoval membránovou frakci, byl promyt v 250 μl pufru A (6000 rcf; 4 °C; 5 minut) a následně resuspendován v pufru A o stejném objemu, jako měl supernatant (objem 1). Z membránové frakce bylo opět odebráno 100 μl , které byly smíseny s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, výsledná koncentrace buněk ve vzorku byla $2,6 \times 10^6$ buněk/ μl .

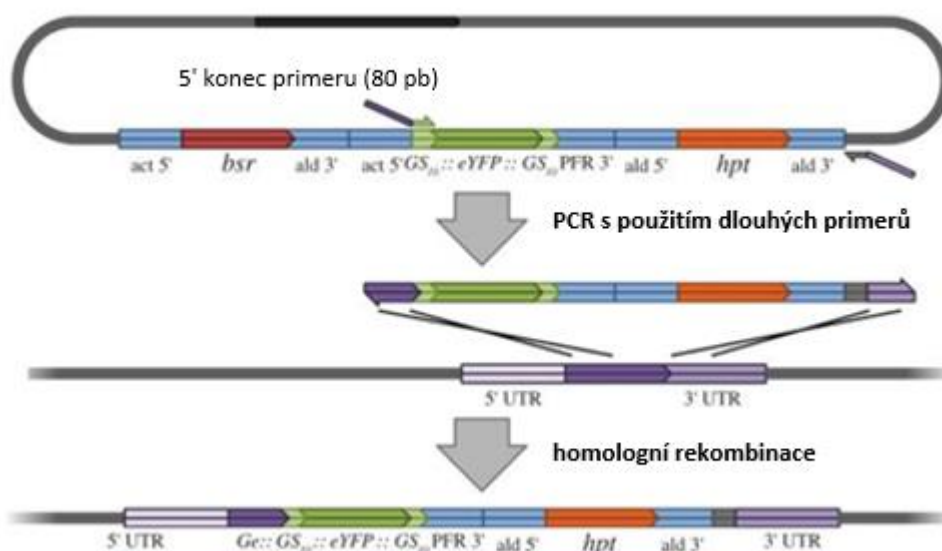
U některých vzorků byla provedena dále karbonátová extrakce a ultracentrifugace, která zajistila rozdělení membránové frakce na periferální membránovou frakci a integrální membránovou frakci. Zbývající suspenze peletu (membránové frakce) s pufrům A byla centrifugována (6000 rcf; 4 °C; 5 minut), pelet byl pečlivě resuspendován s 400 μl pufru B (0,1 M Na_2CO_3 připraven v deionizované vodě). Suspenze byla centrifugována v ultracentrifuze (100 000 rcf; 4 °C; 23 minut). Supernatant, který představoval periferální membránovou frakci, byl přenesen do nové zkumavky a jeho objem byl změřen (objem 2). 100 μl supernatantu bylo smíseno s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, výsledná koncentrace buněk ve vzorku byla $1,3 \times 10^6$ buněk/ μl . Pelet, který představoval integrální membránovou frakci, byl promyt v 500 μl pufru B (100 000 rcf; 4 °C; 12 minut). Po promytí byl pelet resuspendován v pufru B, jehož objem byl stejný jako objem periferální membránové frakce (objem 2). 100 μl této suspenze bylo smícháno s 50 μl 3 \times barviva SDS-PAGE, výsledná koncentrace buněk ve vzorku byla $1,3 \times 10^6$ buněk/ μl . Všechny frakce smísené s barvivem SDS-PAGE byly zahřáty v termobloku při 97 °C 10 minut a poté mohly být uchovány v mrazáku při -20 °C. Před SDS-PAGE elektroforézou byly vzorky znovu zahřáty v termobloku při 95 °C 10 minut. Dále byl proveden Western blot a imunodetekce (viz 3.3. Biochemické metody).

4. Výsledky

4.1. Příprava DNA pro genetickou manipulaci *Trypanosoma brucei* za účelem V5-tagování mitoribozomálních proteinů a assembly faktorů

Abychom mohli dále studovat biogenezi malé mitoribozomální podjednotky *T. brucei*, vybrali jsme tři proteiny, které jsme označili V5 peptidem. Takto označené proteiny jsme později v experimentech detekovali s použitím protilátky proti V5 peptidu. Celkem jsme tagovali 3 proteiny malé mitoribozomální podjednotky a jejího prekursoru (assemblosomu). Jednalo se o dva assembly faktory mt-SAF16, mt-SAF24 a jeden protein malé mitoribozomální podjednotky mS64.

Plazmidy odvozené od pPOTv4 (Dean et al. 2015), které nesly sekvenci pro V5 peptid a rezistenci na specifické antibiotikum hygromycin, jsme nejprve namnožili v bakteriálních buňkách *E. coli*, z nichž jsme je poté izolovali a získali jsme 394 ng/μl plazmidové DNA. Tu jsme následně použili jako templát pro PCR reakci, při které jsme také využili dlouhé primery. Cílem použití dlouhých primerů bylo získat PCR produkt, který bude obsahovat terminální sekvence pro homologní rekombinaci do příslušného místa genomu *T. brucei* (viz obrázek č. 4).



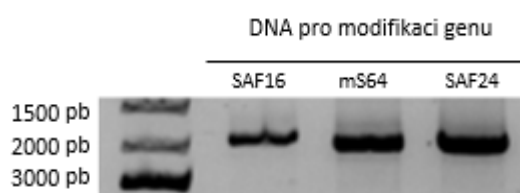
Obrázek č. 4: PCR tagování s využitím dlouhých primerů (převzato a upraveno z Dean et al. 2015).

Pro každý gen kódující protein, který jsme tagovali, jsme nechali připravit vlastní pár primerů (viz tabulka č. III) tak, abychom mohli úsek DNA pro transfekci pomocí nich amplifikovat a později vložit na specifické místo do genomu *T. brucei*.

Tabulka č. III: Přřazení dlouhých primerů k modifikovaným genům.

Forward primer	Reverse primer	Modifikovaný gen
AZ 1495	AZ 1496	mt-SAF16
AZ 1501	AZ 1502	mS64
AZ 1348	AZ 1349	mt-SAF24

Pro odstranění primerů a dalších složek reakce PCR a pro zvýšenou koncentraci vzorků jsme PCR produkty před transfekcí precipitovali pomocí ethanolu. Získali jsme 990 ng/μl DNA pro modifikaci genu SAF16, 723 ng/μl DNA pro modifikaci genu SAF24 a 858 ng/μl DNA pro modifikaci genu mS64. Velikosti produktů jsme ověřili na agarózovém gelu (viz obrázek č. 4), přičemž očekávaná velikost fragmentů pro modifikaci genu mt-SAF16, mt-SAF24 a mS64 byla 2071 párů bází.



Obrázek č. 4: Velikosti amplifikované DNA, sloužící jako fragment pro translaci *T. brucei*, na agarózovém gelu.

4.2. Vytvoření geneticky modifikovaných buněčných linií *Trypanosoma brucei* tagováním mitoribozomálních proteinů a jejich prekurzorů V5 tagem

Celkem jsme modifikovali tři parentální buněčné linie hmyzího stádia *T. brucei* – p-Sm-Ox linii, mt-SAF16 RNAi linii a mt-SAF18 RNAi linii. RNAi linie mají schopnost blokovat produkci specifického proteinu na základě RNA interference. Po přidání antibiotika tetracyklinu se aktivuje specifická kazeta pro produkci dvouřetězcové RNA, kterou poté RNAi mechanismus zpracuje a targetuje cílovou mRNA. Do genomu trypanozom jsme vkládali připravený PCR produkt, jenž obsahoval sekvenci pro V5 peptid a specifické antibiobiotikum – hygromycin. Námi modifikované geny se vyskytovaly v jaderném genomu

trypanozom a do mitochondrie byly dopraveny až po translaci. Tyto geny mají v oblasti 5' konce presekvenční, která transport do mitochondrie umožňuje (Vögtle et al. 2009; Abe et al. 2000), a jelikož jsme nechtěli tuto část genu narušit, navrhli jsme dlouhé primery tak, aby se tag vložil na 3' konec příslušného genu. Fragment DNA jsme do buňky vložili elektroporací. Celkem jsme takto vytvořili osm modifikovaných linií a v průběhu dvou až tří týdnů jsme vyseletovali od každé modifikované linie několik klonů (viz tabulka č. IV), u kterých jsme očekávali správně vložený fragment a expresi tagovaných proteinů.

Tabulka č. IV: Množství selektovaných a potvrzených klonů u jednotlivých modifikovaných buněčných linií.

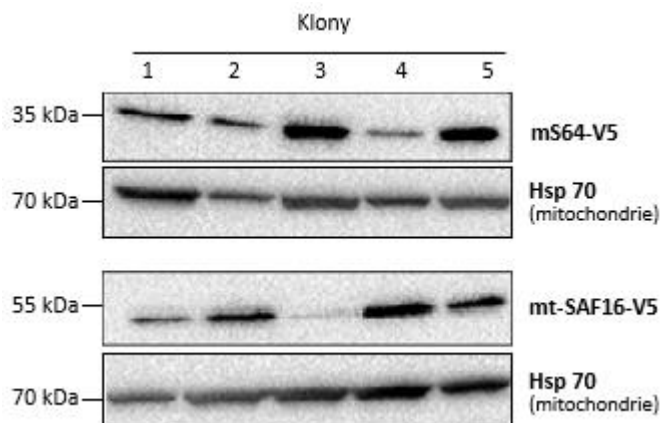
Připravené buněčné linie	Počet selektovaných klonů	Počet potvrzených klonů
p-Sm-Ox mt-SAF16-V5	5	5
p-Sm-Ox mS64-V5	5	5
mt-SAF16 RNAi mt-SAF16-V5	3	3
mt-SAF16 RNAi mt-SAF24-V5	2	1
mt-SAF16 RNAi mS64-V5	4	4
mt-SAF18 RNAi mt-SAF16-V5	4	3
mt-SAF18 RNAi mt-SAF24-V5	4	2
mt-SAF18 RNAi mS64-V5	4	2

4.3. Ověření exprese všech proteinů označených V5 tagem imunodetekcí

Abychom ověřili expresi modifikovaných proteinů, připravili jsme celobuněčné lyzáty od všech klonů, které se nám podařilo vyselektovat. Celobuněčné lyzáty jsme připravili s použitím SDS. Výsledné vzorky jsme separovali na SDS-PAGE elektroforéze. Abychom mohli proteiny detekovat, přenesli jsme je z gelu na blotovací membránu za pomoci Western blotu. Signály proteinů jsme vizualizovali imunodetekcí s využitím primární a sekundární protilátky. Jako primární protilátku pro detekci tagovaných proteinů jsme použili myší protilátku anti-V5 a jako sekundární protilátku kozí anti-myší protilátku značenou enzymem HRP. Na základě vizualizace jsme ověřili, které klony exprimují vybrané proteiny s V5 tagem a které nikoliv, a zkontrolovali jsme velikosti proteinů, přičemž víme, že správné velikosti proteinů s V5 peptidem jsou následující: mS64-V5 – 30,6 kDa, mt-SAF16-V5 – 50,9 kDa, mt-SAF24-V5 – 34,6 kDa. U většiny modifikovaných buněčných

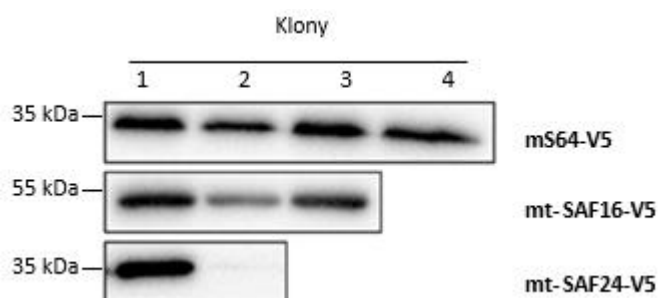
linií byly detekovány pozitivní signály u více než jednoho klonu. V tomto případě jsme vybrali pro další experimenty klon, který měl nejlepší signál.

U buněčných linií p-Sm-Ox mS64-V5 a p-Sm-Ox mt-SAF16-V5 se nám podařilo vyselektovat pět klonů a u všech těchto klonů jsme detekovali protein o správné velikosti, i když intenzita signálu nebyla konzistentní mezi jednotlivými klony. Jako kontrola byl použit mitochondriální protein tepelného šoku 70 (heat shock protein 70, Hsp70) (viz obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Celobuněčné lyzáty klonů buněčných linií p-Sm-Ox mS64-V5 a p-Sm-Ox mt-SAF16-V5.

U buněčné linie mt-SAF16 RNAi mS64-V5 jsme vyselektovali čtyři klony a u mt-SAF16 RNAi mt-SAF16-V5 tři klony, u kterých jsme protein detekovali, avšak u linie mt-SAF16 RNAi mt-SAF24-V5 jsme ze dvou získaných klonů protein detekovali pouze u jednoho z nich (viz obrázek č. 6).



Obrázek č. 6: Celobuněčné lyzáty klonů buněčných linií mt-SAF16 RNAi mS64-V5, mt-SAF16 RNAi mt-SAF16-V5 a mt-SAF16 RNAi mt-SAF24-V5.

U všech buněčných linií mt-SAF18 RNAi jsme získali čtyři buněčné klony, avšak u linie mt-SAF18 RNAi mS64-V5 byly aktivní pouze dva klony, stejně tak jako u linie

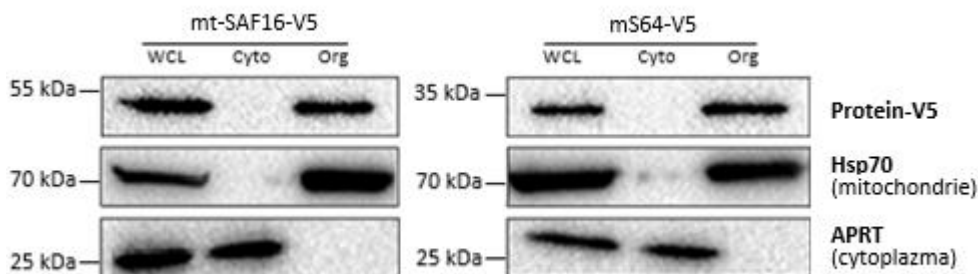
mt-SAF18 RNAi mt-SAF24-V5. U linie mt-SAF18 RNAi mt-SAF16-V5 jsme signál proteinu detekovali u tří klonů (viz obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: Celobuněčné lyzáty klonů buněčných linií mt-SAF18 RNAi mS64-V5, mt-SAF18 RNAi mt-SAF16-V5, mt-SAF18 RNAi mt-SAF24-V5.

U linií p-Sm-Ox mt-SAF16-V5 a p-Sm-Ox mS64-V5 jsme dále rozdělili obsah buněk na organelární a cytosolickou část, abychom ověřili, zda se tagované proteiny nacházejí v organelární části buňky. Využili jsme k tomu digitonin, který za námi používaných podmínek lyzoval cytoplazmatickou membránu buněk, ale organelární membrány ponechal neporušené. Díky tomu jsme mohli z buněk izolovat pouze organely a ověřit tak, že se námi tagované proteiny mohly transportovat do mitochondrie. Po rozdělení jsme proteiny organelární i cytosolické frakce separovali na SDS-PAGE elektroforéze a provedli jsme imunodetekci příslušných proteinů.

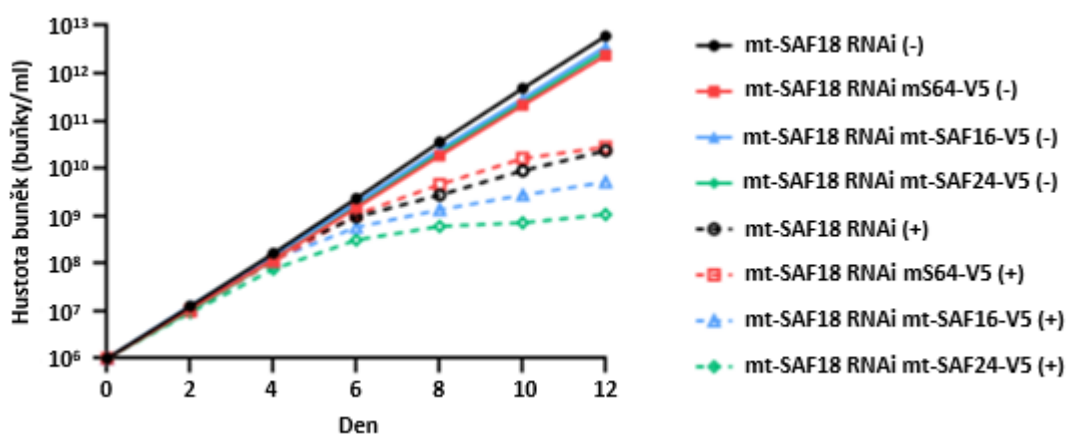
Na obrázku č. 8 je možné vidět, že se námi tagované proteiny vyskytují v organelární části buňky, nikoliv v části cytosolické, čímž jsme ověřili správnou lokalizaci tagovaných proteinů. Jako mitochondriální marker byl použit protein Hsp70, cytoplazmatický marker byl použit protein adenin fosforibosyltransferáza (APRT).



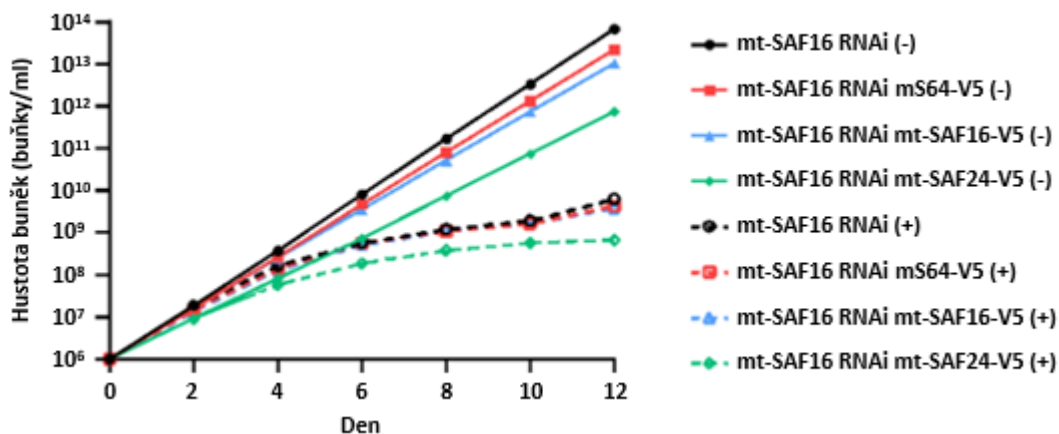
Obrázek č. 8: Subcelulární frakcionace buněčných linií p-Sm-Ox mt-SAF16-V5 a p-Sm-Ox mS64. WCL značí celobuněčný lyzáty (whole cell lysate), Cyto značí cytosolickou frakci a Org značí organelární frakci.

4.4. Submitochondriální lokalizace V5 tagovaných proteinů mitoribozomů a jejich prekurzorů

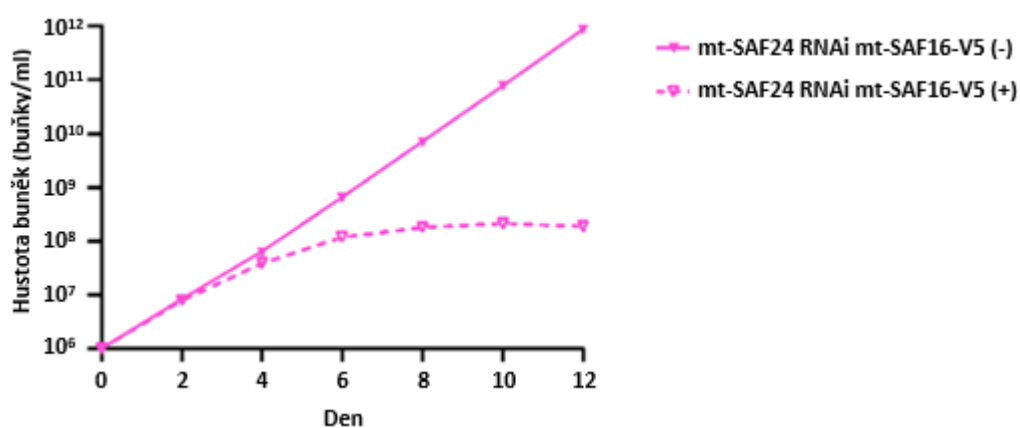
Geneticky modifikované buněčné linie, které exprimují proteiny mitoribozomu a jeho prekurzoru s V5 tagem se mohou využít při dalších experimentech, které objasňují biogenezi mitoribozomálních podjednotek. My jsme dále pracovali s liniemi mt-SAF16 RNAi mt-SAF16-V5, mt-SAF16 RNAi mt-SAF24-V5, mt-SAF16 RNAi mS64-V5, mt-SAF18 RNAi mt-SAF16-V5, mt-SAF18 RNAi mt-SAF24-V5, mt-SAF18 RNAi mS64-V5. Také jsme pracovali s linií, která byla dříve modifikována v naší laboratoři stejnými postupy. Jedná se o linii mt-SAF24 RNAi mt-SAF16-V5. Submitochondriální lokalizaci tagovaných proteinů jsme provedli jak u RNAi linií neindukovaných, tak u linií indukovaných, přičemž indukované linie jsme připravili přidáním tetracyklinu do média. U každé RNAi linie jsme provedli růstovou křivku (viz obrázky č. 9-11), kde jsme porovnali růst buněk indukovaných i neindukovaných, abychom si ověřili, že snížení exprese daných proteinů je pro buňku problém, a tím pádem se snižuje i celkový počet indukovaných buněk *T. brucei*. Data pro růstovou křivku jsme sbírali 12 dní, abychom zjistili, který den se RNA interference projeví (tímto děkuji MSc. Jonathanu Wongovi za provedení a poskytnutí dat růstových křivek). Na základě růstových křivek jsme zjistili, že vliv RNA interference u všech indukovaných buněčných linií je zřejmý od čtvrtého dne po přidání tetracyklinu, proto jsme také v tento den sklídili buňky a izolovali jsme z nich mitochondrie.



Obrázek č. 9: Růstová křivka modifikovaných buněčných linií parentální linie mt-SAF18 RNAi. Neindukované buněčné linie jsou značeny (-), indukované buněčné linie jsou značeny (+).



Obrázek č. 10: Růstová křivka modifikovaných buněčných linií parentální linie *mt-SAF16* RNAi. Neindukované buněčné linie jsou značeny (-), indukované buněčné linie jsou značeny (+).

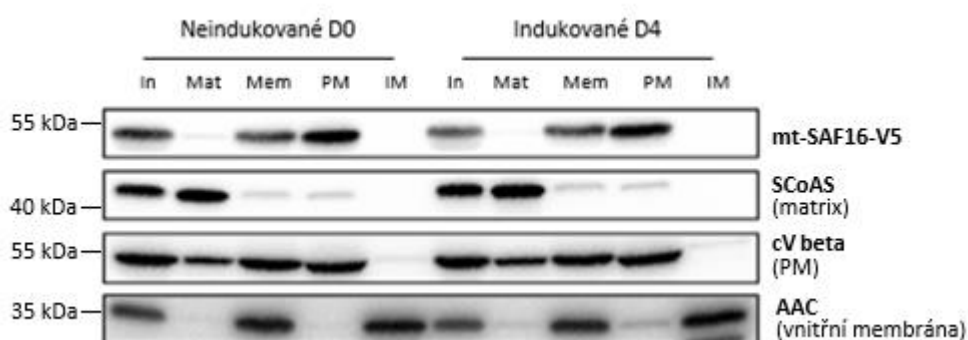


Obrázek č. 11: Růstová křivka modifikované buněčné linie *mt-SAF24* RNAi *mt-SAF16-V5*. Neindukované buněčné linie jsou značeny (-), indukované buněčné linie jsou značeny (+).

Z neindukovaných RNAi parentálních linií jsme rovněž izolovali mitochondrie. Následně jsme provedli submitochondriální lokalizaci tagovaných proteinů, díky které jsme byli schopni zjistit, zda se daný protein nachází volně v matrix mitochondrie nebo vázaný k vnitřní mitochondriální membráně. Tato lokalizace pro nás byla stěžejní, jelikož tagované proteiny představovaly jakési zástupce jednotlivých prekurzorů malé mitoribozomální podjednotky. Assembly faktory *mt-SAF16* a *mt-SAF24* se nachází pouze v assemblosomu a *mS64* v pozdním intermediátu a maturované podjednotce (Lenarčič et al. 2022; Saurer et al. 2019; Ramrath et al. 2018). Podle naší hypotézy (viz 1.5. Biogeneze malé mitoribozomální podjednotky u *Trypanosoma brucei*) bychom tedy měli assembly faktory *mt-SAF16* a *mt-SAF24* detekovat v membránové frakci. U proteinu *mS64* jsme předpokládali, že by se

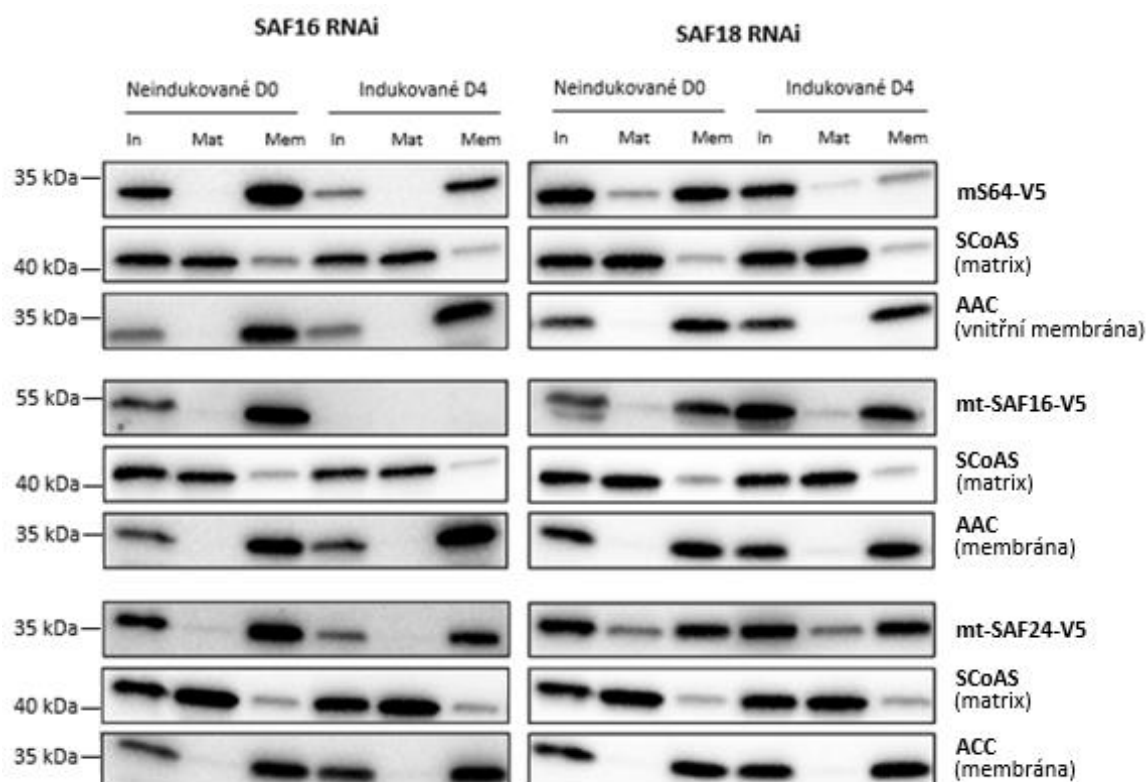
mohl objevit jak ve frakci matrix, tak ve frakci membránové, jelikož je součástí jak maturované podjednotky, tak jejího pozdního intermediátu (Ramrath et al. 2018; Lenarčič et al. 2022). U linie mt-SAF24 RNAi mt-SAF16-V5 jsme membránové proteiny dále rozdělili na periferální a integrální. Použili jsme k tomu uhličitan sodný, jehož roztok má pH 11,0. Díky takto vysokému pH se zeslabí vazby mezi proteiny a periferální proteiny se tak uvolní (Kim et al. 2015). Proteiny ze všech vzorků jsme poté separovali pomocí SDS-PAGE elektroforézy a imunodetekovali na membráně (viz obrázky č. 12 a 13). Jako marker vnitřní mitochondriální membrány jsme pro výsledky submitochondriální lokalizace použili antiporter ATP a ADP (ATP/ADP carrier, AAC), jako markery matrix jsme použili succinyl-koenzym A syntetázu (SCoAS) a protein pro editaci kinetoplastidové RNA 1 (kinetoplastid RNA editing protein 1, KREPA1). Jako marker periferálních proteinů vnitřní mitochondriální membrány jsme zvolili podjednotku ATP syntázy (neboli komplexu V podjednotky beta oxidativní fosforylace, cV beta) a jako marker vnější mitochondriální membrány jsme použili aniontové kanály závislé na napětí (voltage-dependent anion channel, VDAC).

Výsledné signály tagovaného assembly faktoru mt-SAF16 u neindukované parentální linie mt-SAF24 RNAi jsme detekovali v periferální membránové frakci. U indukované linie jsme očekávali, že se mt-SAF16 signál přesune do frakce matrix z důvodu nepřítomnosti assembly faktoru mt-SAF24, který měl podle naší hypotézy celý assemblosom vázat k membráně. Avšak i u indukované linie jsme nadále mt-SAF16 detekovali v periferální membránové frakci (viz obrázek č. 12).



Obrázek č. 12: Výsledky submitochondriální lokalizace indukované a neindukované modifikované buněčné linie mt-SAF24 RNAi mt-SAF16-V5. In značí input, Mat značí frakci matrix, Mem značí membránovou frakci, PM značí periferální membránovou frakci, IM značí integrální membránovou frakci.

U indukovaných i neindukovaných parentálních linií mt-SAF16 RNAi a mt-SAF18 RNAi jsme vyšší signály všech tagovaných proteinů detekovali v membránové frakci mitochondrie, což potvrzovalo naši hypotézu. Po indukci buněčných linií jsme pozorovali výrazné snížení signálu u tagovaného proteinu mS64, ukazující na nižší množství malé mitoribozomální podjednotky vlivem RNA interference. U parentální buněčné linie mt-SAF16 RNAi jsme také nezaznamenali žádný signál tagovaného proteinu mt-SAF16 a snížený signál assembly faktoru mt-SAF24, což také dokazuje efektivitu RNA interference (viz obrázek č. 13).

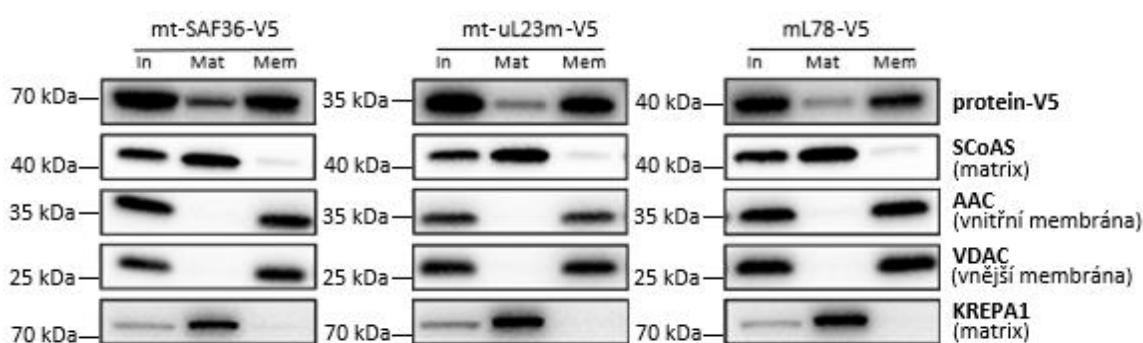


Obrázek č. 13: Výsledky submitochondriální lokalizace tagovaných proteinů indukovaných a neindukovaných parentálních buněčných linií mt-SAF16 RNAi a mt-SAF18 RNAi. In značí input, Mat značí frakci matrix, Mem značí membránovou frakci.

Jelikož výsledky indukované buněčné linie mt-SAF24 RNAi mt-SAF16-V5 nepotvrzovaly naši hypotézu, rozhodli jsme se udělat stejný experiment s dalšími tagovanými proteiny mt-SAF36-V5, mt-uL23m-V5 a mL78-V5 parentálních linií p-Sm-Ox (tyto tagované linie byly připraveny jinými členy skupiny v naší laboratoři). Linie s tagovanými proteiny mt-uL23m a mL78 jsme vybrali pro ověření metody z toho důvodu, že jsou to proteiny velké mitoribozomální podjednotky, která je pravděpodobně během translace a možná také po celou dobu své biogeneze vázaná k membráně (Englmeier et al.

2017; Pfeffer et al. 2015), a proto jsme je očekávali v membránové frakci. mt-SAF36 je assembly faktor malé mitoribozomální podjednotky, který je přítomný ve středním a pozdním intermediátu (Lenarčič et al. 2022), u nichž nepředpokládáme interakci s membránou a jeho signál jsme tedy očekávali v matrix frakci. Proteiny s V5 tagem mají velikost následující: mt-SAF36-V5 – 66 kDa, mt-uL23m-V5 – 34 kDa, mL78-V5 – 40 kDa.

Velkou část tagovaných proteinů velké mitoribozomální podjednotky mt-uL23m a mL78 jsme lokalizovali v membránové frakci, kde jsme je také očekávali. Protein mt-SAF36, který měl být podle naší hypotézy přítomný ve frakci matrix, jsme s větší mírou detekovali ve frakci membránové (viz obrázek č. 14).



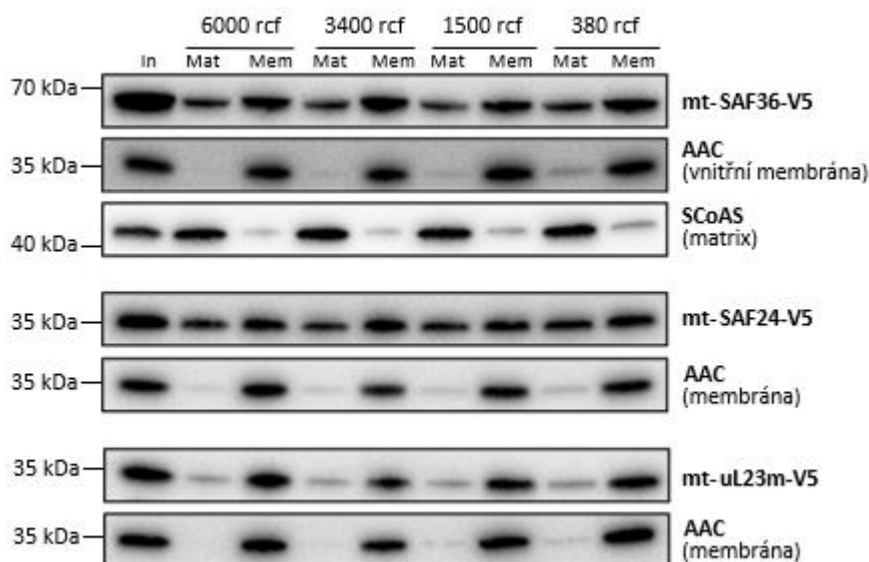
Obrázek č. 14: Submitochondriální lokalizace modifikovaných buněčných linií parentální linie p-Sm-Ox. In značí input, Mat značí frakci matrix, Mem značí membránovou frakci.

Jelikož výsledky nadále nepodporovaly naši hypotézu, museli jsme nejdříve ověřit, zda není chyba v postupu přípravy vzorků. Zaměřili jsme se na otáčky centrifugace vzorku před rozdělením mitochondrií na frakci membránovou a matrix. Otáčky (6000 rcf) totiž mohly být natolik vysoké, že se do peletu usadily i proteiny velkých komplexů z matrix. Provedli jsme tedy znovu submitochondriální lokalizaci, tentokrát s liniemi mt-SAF16 RNAi mt-SAF24-V5, p-Sm-Ox mt-SAF36-V5 a p-Sm-Ox mt-uL23m-V5. Postupovali jsme stejným způsobem, jako v předešlých případech, s jediným rozdílem a to tím, že jsme před separací frakce matrix rozdělili vzorky mitochondrií vybraných buněčných linií do čtyř zkumavek a jednotlivé vzorky zpracovávali jinou rychlostí otáček (viz tabulka č. V).

Tabulka č. V: Rychlost otáček vzorků buněčných linií.

Rychlost otáček (rcf)			
Zkumavka 1	Zkumavka 2	Zkumavka 3	Zkumavka 4
380	1500	3400	6000

Na obrázku č. 15 můžeme vidět, že vzorky s nižší rychlostí otáček ukazují stejné výsledky jako vzorky s původní rychlostí otáček (6000 rcf), tj. že jsme větší část signálu assembly faktoru mt-SAF36 i celý obsah membránového proteinu AAC detekovali v membránové frakci i u nejnižších otáček (380 rcf).



Obrázek č. 15: Submitochondriální lokalizace modifikovaných buněčných linií při různých otáčkách/min. In značí input, Mat značí frakci matrix, Mem značí membránovou frakci.

Další experiment jsme provedli tentokrát pouze s linií p-Sm-Ox mt-SAF36-V5. Cílem bylo vyloučit možnost, že assembly faktor mt-SAF36 stabilně interaguje s kinetoplastem, který by při centrifugaci mohl díky své značné velikosti sedimentovat spolu s membránovou frakcí. Abychom ověřili i tuto možnost, po lyzování mitochondrií jsme vzorek rozdělili do čtyř zkumavek, tak aby každá zkumavka obsahovala lyzované mitochondrie z $2,5 \times 10^8$ buněk. Vzorky jsme dále ošetřili buď 20 μ l DNázy a 1 μ l 0,1 M CaCl₂, 20 μ l RNázy nebo oběma enzymy, kdy jsme přidali 20 μ l od každého enzymu a 1 μ l 0,1 M CaCl₂. Poslední zkumavka sloužila jako negativní kontrola. Po jedné hodině působení DNáz a RNáz na ledu jsme zkumavky zahřáli na 65-70 °C po dobu 10 minut, abychom DNázu a RNázu inaktivovali. Se vzorky jsme dále postupovali podle původního postupu metody submitochondriální lokalizace tagovaných proteinů.

Z výsledků je zřejmé, že přítomnost assembly faktoru mt-SAF36 membránové frakci nebyla ovlivněna ošetřením DNázou nebo RNázou, jelikož jsme silnější signál assembly

faktoru mt-SAF36 znovu detekovali v membránové frakci. Po použití RNázy jsme pozorovali nižší signál tagovaného assembly faktoru (viz obrázek č. 16).



Obrázek č. 16: Submitochondriální lokalizace modifikované buněčné linie *p-Sm-Ox mt-SAF36-V5* ošetřené DNázou a RNázou. *In* značí input, *Mat* značí frakci matrix, *Mem* značí membránovou frakci.

5. Diskuze

Cílem naší práce bylo připravit geneticky modifikované buněčné linie hmyzího stádia trypanozom, které budou exprimovat námi vybrané proteiny mitochondriálního ribosomu a jeho prekurzorů s epitopem pro imunodetekci. Po vytvoření modifikovaných linií bylo naším záměrem ověřit lokalizaci námi modifikovaných proteinů v rámci mitochondrie pomocí submitochondriální frakcionace a otestovat, zda prekurzory malé mitoribozomální podjednotky, obsahující takto značené proteiny, asociují s vnitřní mitochondriální membránou, anebo zda se nachází volně v matrix.

Podle naší hypotézy assemblosom malé mitoribozomální podjednotky asociuje s vnitřní membránou mitochondrie. Střední intermediát a pozdní intermediát podjednotky podle výsledků z kryo-elektronové mikroskopie nevykazují žádnou možnou vazbu k membráně (Saurer et al. 2019; Lenarčič et al. 2022). Je tedy velmi pravděpodobné, že se oba intermediáty nacházejí volně v matrix do chvíle, než se pozdní prekurzor přemění na maturovanou podjednotku. Maturovaná malá mitoribozomální podjednotka se spojí s velkou mitoribozomální podjednotkou, jež v průběhu i po maturaci nejspíše zůstává asociována s vnitřní mitochondriální membránou, jako to je pravděpodobné u lidské velké podjednotky mitoribozomu. Spojením malé a velké podjednotky vznikne celek mitoribozomu schopný vykonávat translaci. Složený a maturovaný mitoribozom byl u jiných organismů vázán k membráně a je pravděpodobné, že i u trypanozom je s membránou asociován (Englmeier et al. 2017; Pfeffer et al. 2015).

Pro potvrzení naší hypotézy jsme se rozhodli submitochondriálně lokalizovat proteiny které byly obsaženy v jednotlivých prekurzorech, a jeden protein, jenž byl součástí maturované malé mitoribozomální podjednotky. U parentálních buněčných linií, které byly již dříve modifikovány a byly schopny potlačit expresi specifického genu díky RNA interferenci, jsme submitochondriální lokalizaci námi tagovaných proteinů provedli jak u neindukovaných, tak u indukovaných vzorků. U indukovaných vzorků, po omezení exprese genu pro protein mt-SAF24, který měl dle hypotézy vázat celý assemblosom k membráně, jsme však proteiny tvořící assemblosom nadále detekovali s výraznou převahou v membránové frakci mitochondrie. To byl neočekávaný výsledek, který výrazně popíral naši hypotézu a z něhož by se dalo usoudit, že assemblosom není s membránou asociován pouze díky assembly faktoru mt-SAF24, ale že nejspíše existuje i jiná forma vazby. Na základě tohoto výsledku jsme se rozhodli provést submitochondriální lokalizaci dalších proteinů, včetně proteinu mt-SAF36.

Assembly faktor mt-SAF36 je obsažen ve středním a pozdním intermediátu malé mitoribozomální podjednotky. Na základě naší hypotézy jsme tedy jeho signál předpokládali ve frakci matrix. Téměř celý signál tohoto proteinu jsme však také detekovali v membránové frakci. Jelikož výsledky nadále nepodporovaly naši hypotézu, rozhodli jsme se nejprve ověřit, zda není problém v postupu přípravy vzorků. Provedli jsme tedy znovu submitochondriální lokalizaci, kde jsme se primárně zaměřili na protein mt-SAF36. Vzorky mitochondrií jsme rozdělili do čtyř zkumavek, přičemž u tří z nich jsme snížili rychlost otáček na 3400 rcf, 1500 rcf a 380 rcf před oddělením frakce matrix od frakce membránové. Čtvrtou zkumavku jsme centrifugovali s původní rychlostí otáček (6000 rcf). Tento kontrolní experiment jsme provedli, abychom ověřili, že chyba není v příliš vysokých otáčkách, při nichž by se do peletu mohly usazovat i větší komplexy z frakce matrix. To se nám však nepotvrdilo, a i při nejnižších otáčkách se nadále značený assembly faktor mt-SAF36 nacházel v membránové frakci.

Další možné vysvětlení těchto nepředpokladatelných výsledků bylo, že prekurzory asociují s nějakou velkou strukturou, která by mohla sedimentovat do peletu. Takovým komplexem mohl být kinetoplast. Ačkoliv je více pravděpodobné, že kinetoplast sám o sobě není struktura dostatečně velká natolik, aby se při centrifugaci usadila do membránové frakce, bylo nutné i tuto možnost prověřit. Na základě toho jsme provedli experiment, v němž jsme přidali do vzorku mitochondrií buněčné linie p-Sm-Ox mt-SAF36-V5 DNázu, a předpokládali jsme, že když se DNA naštěpí, kinetoplast se rozvolní. Pokud by opravdu asocioval s prekurzory, mohli bychom je tentokrát detekovat ve frakci matrix. Assembly faktor jsme však i nadále detekovali v membránové frakci, z čehož je pravděpodobné, že k vazbě mezi kinetoplastem a prekurzory nedochází, a oba intermediáty se tedy opravdu nachází vázané k vnitřní membráně mitochondrie. Dalším možným vysvětlením tohoto výsledku je, že se i po naštěpení DNA kinetoplast nerozvolnil, a nedošlo tak k žádné změně oproti předchozím výsledkům. Do další části vzorků mitochondrií buněčné linie p-Sm-Ox mt-SAF36-V5 jsme přidali RNázu. U těchto vzorků jsme při detekci zaznamenali nižší signál u tagovaného proteinu mt-SAF36, a tudíž se ukázalo, že RNáza působením na mt-rRNA značně poškodila biogenezi malé mitoribozomální podjednotky.

Naše hypotéza byla založena na snímcích z elektronového mikroskopu, které zachycují prekurzory malé mitoribozomální podjednotky *T. brucei*. Kryo-elektronová mikroskopie odhalila, že assemblosom je prostřednictvím assembly faktoru mt-SAF24 vázaný k neznámé struktuře diskovitého tvaru (Saurer et al. 2019), která má dle naší

hypotézy představovat vnitřní mitochondriální membránu. U následujících dvou zachycených prekurzorů, středního a pozdního intermediátu, nebyla nalezena žádná asociace s neznámou strukturou a zároveň tyto prekurzory již neobsahovaly assembly faktor mt-SAF24 (Lenarčič et al. 2022). Na základě toho byla vytvořena naše hypotéza, kterou jsme se rozhodli experimentálně ověřit. Tento výzkum byl unikátní v tom, že se jako první zabýval lokalizací prekurzorů malé mitoribozomální podjednotky u *T. brucei*. Z toho důvodu však nelze náš výsledek srovnat s jinými výzkumy stejného druhu. Předchozí studie využívající stejný postup submitochondriální frakcionace však ukázala, že veškerý signál obou mt-rRNA molekul se vyskytuje pouze v membránové frakci mitochondrie. Stejná frakce také zahrnuje tři různé proteiny obsahující pentatrikopeptidové repetice (PPR), které souvisí s translací v mitochondriích *T. brucei* (Pusnik et al. 2007). PPR3 (KRIPP3/mt-LAF26) se později ukázal být assembly faktor velké podjednotky (Jaskolowski et al. 2020; Soufari et al. 2020; Tobiasson et al. 2021), PPR2 (KRIPP2/mt-SAF2) je assembly faktor malé podjednotky (Saurer et al. 2019), a PPR5 (mL75) je součástí velké podjednotky (Ramrath et al., 2018). Jelikož i všechny naše tagované proteiny jsme detekovali v membránové frakci, dalo by se usuzovat, že se celá biogeneze odehrává v asociaci s vnitřní mitoribozomální membránou, stejně tak jako je tomu pravděpodobně u biogeneze velké mitoribozomální podjednotky (Englmeier et al. 2017; Pfeffer et al. 2015). Kdyby se oba intermediáty malé mitoribozomální podjednotky nacházely volně v matrix, dalo by se předpokládat, že by byl alespoň nějaký malý signál mt-rRNA detekován i ve frakci matrix. I přes to je ale nutné brát v úvahu, že v průběhu biogeneze malé mitoribozomální podjednotky může vznikat prekurzor, který není vázaný k vnitřní mitochondriální membráně a nachází se volně v matrix. Jeho životnost však může být natolik krátká, že se ho prozatím nepodařilo detekovat ani pomocí kryo-elektronové mikroskopie. Z tohoto důvodu my z našich výsledů v tuto chvíli nemůžeme s jistotou říct, že jsou opravdu všechny prekurzory malé mitoribozomální podjednotky vázány v průběhu biogeneze k membráně, a že se tedy celá biogeneze malé mitoribozomální podjednotky odehrává na membráně.

Abychom mohli dále studovat malou mitoribozomální podjednotku a její biogenezi, byl náš další cíl rozdělit jednotlivé ribosomální komplexy na sacharózovém gradientu podle velikosti, a ověřit tak inkorporaci námi modifikovaných proteinů do příslušného komplexu. Tento experiment u nás v laboratoři i přes několik pokusů a úprav nebyl úspěšný, a proto jsme ho nakonec museli z cílů této bakalářské práce vyřadit. Do budoucna je u nás v laboratoři v plánu tento experiment optimalizovat. Zároveň plánujeme znovu provést

submitochondriální lokalizaci assembly faktoru mt-SAF36. Při imunodetekci by bylo vhodné použít další marker, kterým by byl protein, o němž s jistotou víme, že je vázaný s kinetoplastem. Tímto způsobem by bylo možné definitivně určit, zda se kinetoplast vyskytuje ve frakci matrix nebo membrány mitochondrie. Kdyby byl lokalizován v membránové frakci, bylo by zřejmé, že kinetoplast je dostatečně velká struktura na to, aby sedimentoval do membránové frakce. Pokud by jeho struktura skutečně byla vázána s prekurzory malé mitoribozomální podjednotky, stále by bylo možné, že tyto komplexy sedimentovali z matrix do membránové frakce pouze na základě asociace s kinetoplastem.

6. Závěr

Tato bakalářská práce přispěla ke studiu biogeneze malé mitoribozomální podjednotky hmyzího stádia *T. brucei* především proto, že se jako první zabývala lokalizací jejich prozatím detekovaných prekurzorů. V rámci této práce jsem připravila modifikované buněčné linie trypanozom, které exprimují vybrané proteiny malé mitoribozomální podjednotky a jejich prekurzorů s V5 tagem, díky kterému je možné je imunodetektovat. Nejenom u mnou modifikovaných linií jsem tagované proteiny lokalizovala v rámci mitochondrie. Výsledky, kterých jsem dosáhla, neodpovídají hypotéze, jež byla stanovena na počátku výzkumu. Všechny tagované proteiny jsem s velkou převahou lokalizovala v membránové frakci mitochondrie, ačkoliv jsem u některých předpokládala lokalizaci v mitochondriální matrix. Dále je v plánu důkladněji ověřit jeden z výsledků a optimalizovat další metody, kterými bych mohla výsledky této bakalářské práce definitivně potvrdit.

7. Reference

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., & Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, *100*(5), 551-560. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80691-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80691-1)
- Blanquart, S., & Gascuel, O. (2011). Mitochondrial genes support a common origin of rodent malaria parasites and *Plasmodium falciparum*'s relatives infecting great apes. *BMC evolutionary biology*, *11*, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-70>
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X., Sugimoto, Y., Edwards, P. C., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science*, *346*(6210), 718-722. <https://doi.org/10.1126/science.1258026>
- Brown, B. S. V., Chi, T. B., & Williams, N. (2001). The *Trypanosoma brucei* mitochondrial ATP synthase is developmentally regulated at the level of transcript stability. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *115*(2), 177–187. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00282-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00282-1)
- Brownlee, G. G., & Sanger, F. (1967). Nucleotide sequences from the low molecular weight ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *23*(3), 337–353. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(67\)80109-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(67)80109-8)
- Bruce, D., Harvey, D., Hamerton, A. E., Davey, J. B., & Bruce, L. (1912). *The Morphology of the Trypanosome Causing Disease in Man in Nyasaland*, *85*(581), 423–433. <https://doi.org/10.1098/rspb.1912.0068>
- Capewell, P., Cren-Travaillé, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R. A., Gorman, T. A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G., Jamonneau, V., Weir, W., Stevenson, M. L., O'Neill, K., Cooper, A., Swar, N. R. K., Bucheton, B., Ngoyi, D. M., Garside, P., Rotureau, B., & MacLeod, A. (2016). The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *ELife*, *5*, e17716. <https://doi.org/10.7554/eLife.17716>

- Cayla, M., Rojas, F., Silvester, E., Venter, F., & Matthews, K. R. (2019). African trypanosomes. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3355-5>
- Cox, F. E. G. (2004). History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infectious Disease Clinics of North America*, *18*(2), 231–245. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.004>
- Cross, G. A. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, *71*(3), 393–417. <https://doi.org/10.1017/S003118200004717X>
- Dean, S., Sunter, J., Wheeler, R. J., Hodkinson, I., Gluenz, E., & Gull, K. (2015). A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *Open Biology*, *5*(1), 140197. <https://doi.org/10.1098/rsob.140197>
- Dennerlein, S., Rozanska, A., Wydro, M., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., & Lightowlers, R. N. (2010). Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit. *Biochemical Journal*, *430*(3), 551–558. <https://doi.org/10.1042/BJ20100757>
- Desai, N., Brown, A., Amunts, A., & Ramakrishnan, V. (2017). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science*, *355*(6324), 528–531. <https://doi.org/10.1126/science.aal2415>
- Englmeier, R., Pfeffer, S., & Förster, F. (2017). Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied in Situ by Cryoelectron Tomography. *Structure*, *25*(10), 1574–1581.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.011>
- Esposti, M. D. (2014) Bioenergetic evolution in proteobacteria and mitochondria. *Genome Biol Evol*, *6*(12), 3238–3251. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu257>
- Fairlamb, A. H., Weislogel, P. O., Hoeijmakers, J. H. J., & Borst, P. (1978). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, *76*(2), 293–309. <https://doi.org/10.1083/jcb.76.2.293>

- Figarella, K. (2021). Neuropathogenesis caused by *Trypanosoma brucei*, still an enigma to be unveiled. *Microbial Cell*, 8(4), 73–76. <https://doi.org/10.15698/MIC2021.04.745>
- Gray, M. W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(9), a011403. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011403>
- Greber, B. J., & Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 103–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014343>
- Greber, B. J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., & Ban, N. (2015). The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science*, 348(6232), 303–308. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3872>
- Greber, B. J., Boehringer, D., Leibundgut, M., Bieri, P., Leitner, A., Schmitz, N., Aebersold, R., & Ban, N. (2014). The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, 515(7526), 283–286. <https://doi.org/10.1038/nature13895>
- Harper, N. J., Burnside, C. & Klinge, S. (2023) Principles of mitoribosomal small subunit assembly in eukaryotes. *Nature*, 614(7946), 175–181. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05621-0>
- Hilander, T., Jackson, C. B., Robciuc, M., Bashir, T., & Zhao, H. (2021). The roles of assembly factors in mammalian mitoribosome biogenesis. *Mitochondrion*, 60, 70-84. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.07.008>
- Checchi, F., Filipe, J. A. N., Haydon, D. T., Chandramohan, D., & Chappuis, F. (2008). Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-16>
- Itoh, Y., Khawaja, A., Laptev, I., Cipullo, M., Atanassov, I., Sergiev, P., Rorbach, J., & Amunts, A. (2022) Mechanism of mitoribosomal small subunit biogenesis and preinitiation. *Nature*, 606(7914), 603–608. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04795-x>
- Jacob, A. I., Köhrer, C., Davies, B. W., RajBhandary, U. L., & Walker, G. C. (2013). Conserved bacterial RNase YbeY plays key roles in 70S ribosome quality control and

16S rRNA maturation. *Molecular cell*, 49(3), 427-438.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.025>

Jensen, R. E., & Englund, P. T. (2012). Network news: The replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 66, 473–491. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150057>

Jaskolowski, M., Ramrath, D. J. F., Bieri, P., Niemann, M., Mattei, S., Calderaro, S., Leibundgut, M., Horn, E. K., Boehringer, D., Schneider, A., & Ban, N. (2020). Structural Insights into the Mechanism of Mitoribosomal Large Subunit Biogenesis. *Molecular Cell*, 79(4), 629-644.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.030>

Kennedy, P. G. E. (2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology*, 12(2), 186–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X)

Kim H., Botelho S. C., Park K., & Kim H. (2015). Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Science*, 24(12), 2063–2069. <https://doi.org/10.1002/pro.2817>

Koc, E., C., Burkhart W., Blackburn K., Moyer M. B., Schlatzer D. M., Moseley A., & Spremulli L. L. (2001). The Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43958-43969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106510200>

Krüger, T., Schuster, S., & Engstler, M. (2018). Beyond Blood: African Trypanosomes on the Move. *Trends in Parasitology*, 34(12), 1056–1067. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.08.002>

Lee, K. W., Okot-Kotber, C., LaComb, J. F., & Bogenhagen, D. F. (2013). Mitochondrial ribosomal RNA (rRNA) methyltransferase family members are positioned to modify nascent rRNA in foci near the mitochondrial DNA nucleoid. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31386-31399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515692>

Lenarčič, T., Niemann, M., Ramrath, D. J. F., Calderaro, S., Flugel, T., Saurer, M., Leibundgut, M., Boehringer, D., Prange, C., Horn, E. K., Schneider, A., & Ban, N.

- (2022). Mitochondrial small subunit maturation involves formation of initiation-like complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(3), e2114710118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114710118>
- Lotti, M., Noah, M., Stöffler-Meilicke, M., & Stöffler, G. (1989). Localization of proteins L4, L5, L20 and L25 on the ribosomal surface by immuno-electron microscopy. *MGG Molecular & General Genetics*, 216(2–3), 245–253. <https://doi.org/10.1007/BF00334363>
- Mugnier, M. R., Cross, G. A. M., & Papavasiliou, F. N. (2015). The in vivo dynamics of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Science*, 347(6229), 1470–1473. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4502>
- Njogu, R. M., Whittaker, C. J., & Hill, G. C. (1980). Evidence for a branched electron transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1(1), 13–29. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(80\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(80)90038-9)
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 77–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334>
- Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M., & Förster, F. (2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nature Communications*, 6(1), 6019. <https://doi.org/10.1038/ncomms7019>
- Poltera, A. A., Owor, R., & Cox, J. N. (1977). Pathological aspects of human African trypanosomiasis (HAT) in Uganda. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology*, 373(3), 249–265. <https://doi.org/10.1007/bf00432240>
- Poon, S. K., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., & Kelly, S. (2012). A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. *Open Biology*, 2(2), 110037. <https://doi.org/10.1098/rsob.110037>
- Pusnik, M., Small, I., Read, L. K., Fabbro, T., & Schneider, A. (2007). Pentatricopeptide Repeat Proteins in *Trypanosoma brucei* Function in Mitochondrial Ribosomes.

Molecular and Cellular Biology, 27(19), 6876–6888.
<https://doi.org/10.1128/mcb.00708-07>

Ramrath, D. J. F., Niemann, M., Leibundgut, M., Bieri, P., Prange, C., Horn, E. K., Leitner, A., Boehringer, D., Schneider, A., & Ban, N. (2018). Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science*, 362(6413), eaau7735. <https://doi.org/10.1126/science.aau7735>

Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, 27(21), 1177–1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>

Rozanska, A., Richter-Dennerlein, R., Rorbach, J., Gao, F., Lewis, R. J., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., & Lightowlers, R. N. (2017). The human RNA-binding protein RBFA promotes the maturation of the mitochondrial ribosome. *Biochemical Journal*, 474(13), 2145–2158. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170256>

Saurer, M., Ramrath, D. J. F., Niemann, M., Calderaro, S., Prange, C., Mattei, S., Scaiola, A., Leitner, A., Bieri, P., Horn, E. K., Leibundgut, M., Boehringer, D., Schneider, A., & Ban, N. (2019). Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science*, 362(6413), 1144–1149. <https://doi.org/10.1126/science.aau7735>

Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00762-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00762-1)

Schedlbauer, A., Iturrioz, I., Ochoa-Lizarralde, B., Diercks, T., López-Alonso, J. P., Lavin, J. L., Kaminishi, T., Çapuni, R., Dhimole, N., de Astigarraga, E., Gil-Carton, D., Fucini, P., & Connell, S. R. (2021) A conserved rRNA switch is central to decoding site maturation on the small ribosomal subunit. *Sci Adv*, 7(23), eabf7547. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf7547>

- Schuster, S., Lisack, J., Subota, I., Zimmermann, H., Reuter, C., Mueller, T., Morriswood, B., & Engstler, M. (2021) Unexpected plasticity in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *eLife*, *10*, e66028. <https://doi.org/10.7554/eLife.66028>
- Silvester, E., McWilliam, K. R., & Matthews, K. R. (2017). The cytological events and molecular control of life cycle development of *Trypanosoma brucei* in the mammalian bloodstream. *Pathogens*, *6*(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030029>
- Soufari, H., Parrot, C., Kuhn, L., Waltz, F., & Hashem, Y. (2020). Specific features and assembly of the plant mitochondrial complex I revealed by cryo-EM. *Nat Commun*, *11*(1), 5195. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18814-w>
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., & Frank, J. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*, *107*(3), 373–386. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00539-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00539-6)
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., Van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, *521*(7551), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Strassert, J. F., Tikhonenkov, D. V., Pombert, J. F., Kolisko, M., Tai, V., Mylnikov, A. P., & Keeling, P. J. (2016). *Moramonas marocensis* gen. nov., sp. nov.: a jakobid flagellate isolated from desert soil with a bacteria-like, but bloated mitochondrial genome. *Open Biology*, *6*(2), 150239. <https://doi.org/10.1098/rsob.150239>
- Tobiasson, V., Gahura, O., Aibara, S., Baradaran, R., Zíková, A., & Amunts, A. (2021) Interconnected assembly factors regulate the biogenesis of mitoribosomal large subunit. *EMBO J*, *40*(6), e106292. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106292>.
- Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S. A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., Ribeiro, R. M., Dias, S., Smith, T. K., & Figueiredo, L. M. (2016). *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host and Microbe*, *19*(6), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.002>

- Tu, Y. T., & Barrientos, A. (2015). The human mitochondrial DEAD-box protein DDX28 resides in RNA granules and functions in mitoribosome assembly. *Cell reports*, *10*(6), 854-864. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.033>
- Tyler, K. M., Matthews, K. R., & Gull, K. (2001). Anisomorphic cell division by African trypanosomes. *Protist*, *152*(4), 367-378. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00074>
- Valgardsdottir, R., Ottersen, O. P., & Prydz, H. (2004). Regulated compartmentalization of the putative DEAD-box helicase MDDX28 within the mitochondria in COS-1 cells. *Experimental cell research*, *299*(2), 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.05.019>
- Vögtle, F. N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*, *139*(2), 428-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.045>
- World Health Organization. (2013). Control and surveillance of human African trypanosomiasis. *World Health Organization Technical Report Series*, *984*, 1–23