

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie

Funkční analýza *TbFis1* proteinu u *Trypanosomy*  
*brucei*

Bakalářská práce

**Jiří Tápal**

Vedoucí práce: **Mgr. Hassan Hashimi, PhD.**

Školitel specialista: **RNDr. Eva Horáková, PhD.**

**České Budějovice 2013**

Řápal, J., 2013 Funkční analýza *TbFis1* proteinu u *Trypanosoma brucei*. (Functional analyses of *TbFis1* protein in *Trypanosoma brucei*, Bc. Thesis in Czech)- 47.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

## Anotace:

Mitochondrial fission and fusion are important processes because they control mitochondrial distribution and function. Two proteins play essential role in mitochondrial fission, dynamin-related protein (termed DRP), primarily localized into the cytosol and Fission protein (Fis1), integral membrane protein, which is located in outer mitochondrial membrane. These proteins are conserved across eukaryotic tree. Homologues of Fis1 protein, was found in yeast and in mammals respectively, are necessary for targeting DRP to outer mitochondrial membrane for occurring mitochondrial fission. *Trypanosoma brucei* has single large mitochondria in cell and therefore it is ideally suitable model organism for studying mitochondrial fission, which is important for transmission of one complete mitochondria to each daughter cells during cytokinesis. As TbDRP in *T.brucei*, was already characterized. We aim to identify Fis1 in *T.brucei* and describe its function. In our study we identified a putative homologue of Fis1, which we called TbFis1. We made knock-down cell lineages of this gene. Our data shows that in *T.brucei* the TbFis1 protein is not essential for growth of the parasite as well as we did not observe morphological phenotype. This finding is surprising because a lack of Fis1 protein has strong effect on mitochondrial morphology in yeasts and mammals. So it looks like the function of the protein may differ among organisms.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, 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, 9.12.2013

.....

Jiří Řápal

## **Poděkování:**

Rád bych zde chtěl velice poděkovat Evičce Horákové, která dovedla mou bakalářskou práci do finální podoby. Také bych chtěl poděkovat svému školiteli Hassanovi za jeho pomoc a rady. Obrovský dík patří Lucii Kafkové, která mě školila v metodách a pomáhala mi ve všem, co bylo potřeba ke zdárnému dokončení mé práce. Dále bych chtěl poděkovat Tomášovi, Jirkovi, Piyovi kteří mi dávali cenné rady a Aleši Horákovi za pomoc s fylogenetickou analýzou. Opomenout nesmím také další členy laborky, kterým děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí a také své rodině a přítelkyni za jejich velkou podporu. V neposlední řadě bych rád poděkoval Juliu Lukešovi za možnost pracovat v jeho laboratoři.

## **Rozdělení práce:**

5' a 3' UTR mapování – LK

Příprava *TbFis* RNAi konstruktů – JŘ a LK

Transfekce *T.brucei* – JŘ a LK

Northern analýza – JŘ a LK

Real-time PCR – JŘ a LK

Růstová křivka - JŘ

## Obsah

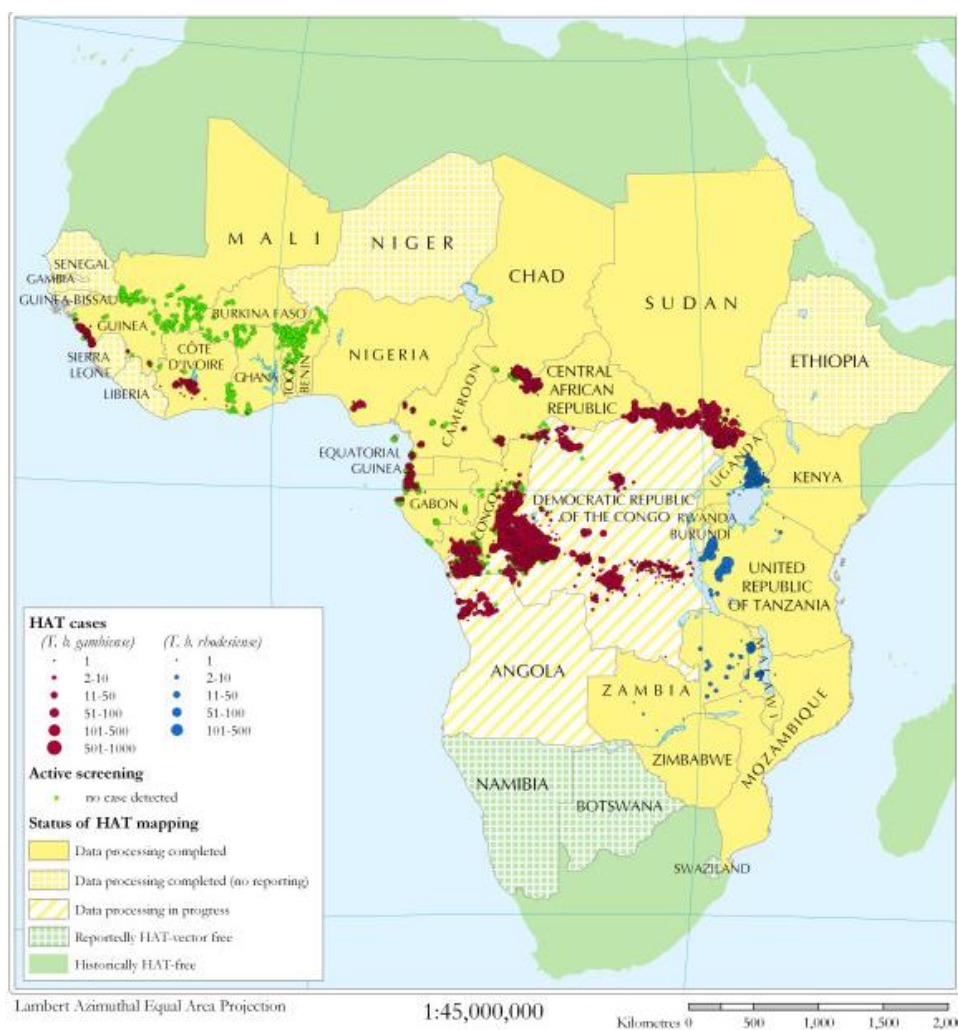
1. Úvod .....	1
1.1. <i>Trypanosoma brucei</i> .....	1
1.2. RNAi.....	3
1.3. Mitochondrie .....	4
1.3.1 Mitochondriální dělení u eukaryot .....	5
2. Cíle práce.....	9
3. Materiál a metody.....	10
3.1. Mapování UTR oblastí u <i>TbFis1</i> .....	10
3.1.1 Výroba cDNA.....	10
3.1.2. Nested PCR .....	10
3.2. Příprava RNAi konstruktů.....	12
3.2.1. Primery pro PCR amplifikaci .....	12
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce .....	12
3.2.3 Kontrola PCR amplifikace .....	13
3.2.4 Ligace do TOPO vektoru.....	13
3.2.5. Transformace do <i>E. coli</i> .....	14
3.2.6. Izolace plazmidové DNA .....	15
3.2.7. Restrikční analýza.....	15
3.2.8. Ligace do p2T7 – 177 plazmidu .....	16
3.2.9. Linearizace p2T7 – 177 plazmidu .....	18
3.2.10. Elektroporace P2T7 – 177/ <i>TbFis1</i> RNAi plazmidu do genomu procyklických stadií <i>T.brucei</i> .....	18
3.2.11 Selekcí pomocí antibiotik .....	19
3.3. Kultivace procyklických stadií <i>T.brucei</i> .....	20
3.4. Northern blotting analýza .....	20
3.4.1. Indukce <i>T.brucei</i> .....	20
3.4.2. RNA izolace .....	20

3.4.3 RNA gelová elektroforéza .....	21
3.4.4. RNA blot .....	22
3.4.5 Membránová pre-hybridizace .....	22
3.4.6 Radioaktivní značení .....	23
3.4.7 Promývání membrány .....	23
3.5. Kvantitativní Real – time PCR (qPCR).....	23
3.5.1. RNA izolace .....	24
3.5.2 Ošetření RNA DNAázou. ....	24
3.5.3 Tvorba cDNA .....	24
3.5.4 qPCR reakce .....	25
3.6. Růstové křivky.....	26
4. Výsledky.....	27
4.1. Fylogenetická analýza .....	27
4.1.2. Fylogenetický strom Fis1 .....	28
4.2. Mapování UTR oblastí .....	29
4.3. <i>TbFis1</i> RNAi konstrukt .....	32
4.4. Ověření <i>TbFis</i> RNAi KD.....	33
4.4.1. Northern analýza.....	34
4.4.2 qPCR.....	34
4.5. Růstová křivka.....	35
5. Diskuze a závěr.....	37
6. Seznam zkratk.....	40
7. Seznam literatury .....	42

# 1. Úvod

## 1.1. *Trypanosoma brucei*

*Trypanosoma brucei*, endoparazitický prvok patřící do řádu Kinetoplastida, způsobuje onemocnění dobytka v subsaharské Africe zvané nagana. Její poddruhy *T. b. gambiense* a *T. b. rhodensiense* vyvolávají spavou nemoc u člověka. První lékařskou zprávu o projevu spavé nemoci publikoval v roce 1734 anglický námořní chirurg John Aktins. Trypanosomy, jako původce spavé nemoci, objevil až v 19. století David Bruce společně s jejich přenašečem mouchou *tse-tse* (Steverding, *et al.*, 2008). Spavá nemoc má devastující účinek na lidské zdraví a prosperitu. Ročně se vyskytne víc než půl milionů případů a nemoc si vyžádá až 70 tis. úmrtí. V Africe existují dvě formy této nemoci, chronická a akutní (jejich rozšíření viz obr.1).

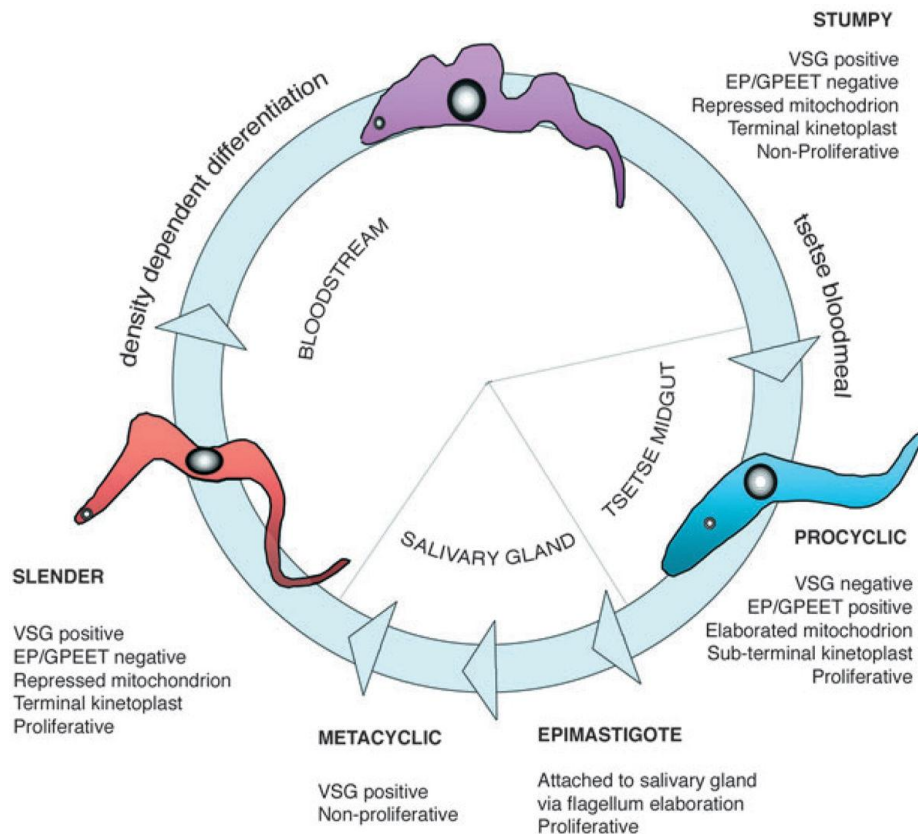


obr.1: Výskyt lidských afrických trypanosom v období 2000 - 2009 (Simarro *et al.*, 2010)

Chronické onemocnění je způsobeno poddruhem *T. b. gambiense*, který se vyskytuje převážně v západní a střední Africe (Cecchi *et al.*, 2009). Tato forma má mírnější průběh, nicméně podle světové zdravotnické organizace má na svědomí až 95% hlášených případů. Akutní forma se vyskytuje především v jižní a východní části Afriky a je způsobena poddruhem *T. b. rhodesiense*. Onemocnění má rychlejší průběh a dříve postihuje centrální nervovou soustavu (Cecchi *et al.*, 2009).

Trypanosomy proliferují v tzv. úzké (slender) stadiu v krevním řečišti u savčího hostitele. Toto stadium produkuje na svém povrchu speciální VSG plášť, který jim umožňuje vyhnout se savčí imunitní odpovědi. S rostoucím počtem parazitů v krevním řečišti se pomalu mění stadium na krátké a tlusté (stumpy), které je připravené na přenos do mouchy *tse-tse*. Po nasátí přecházejí v procyklické stadium (PF) a začínají se dělit ve střevě, mají jiný povrchový plášť než stadia v savčím hostiteli, je sestaven z procyklinů. Poté se dělení pozastaví a buňky migrují do slinných žláz, kde se mění na epimastigoty. Trypanosomy se dále mění na metacyklické stadium, které už neproliferuje, opět získají VSG plášť a jsou připraveny na přenos do nového savčího hostitele (Matthews, *et al.* 2005).

*T. brucei* si bezpochyby zaslouží naši pozornost a to nejenom jako významný lidský patogen, ale také coby zajímavý modelový organismus v molekulární biologii.



obr.2.: Životní cyklus *Trypanosomy brucei*. (Matthews, *et al.* 2005)

## 1.2. RNAi

*Trypanosoma brucei* obsahuje evolučně konzervovaný endogenní systém umožňující umlčení genu, tzv. RNA interferenci (Ketting *et al.*, 2011).

RNA interference (RNAi) byla poprvé popsána u *Caenorhabditis elegans*, ale vyskytuje si u jiných eukaryot, např. v řádu Kinetoplastida, *Drosophila melanogaster* atd. (Fire *et al.*, 1998; Ngo *et al.*, 1998). Zajímavostí je, že v rámci Kinetoplastid došlo ke ztrátě RNAi dráhy u druhu *Trypanosoma vivax* a *Leishmania major* (Lye *et al.*, 2010). Při RNAi dochází k zavedení specifické dvouřetezčové RNA (dsRNA) do buňky a RNA (mRNA) homologní k dsRNA je rozštěpena na malé fragmenty (23-26 nt), což má za následek zastavení syntézy daného proteinu. Rozštěpení probíhá za pomoci ATP- dependentního enzymu Dicer, který má doménu typu RNázy III, umožňující štěpení (Elbashir *et al.*, 2001). Vznikají tzv. malé interferující RNA (siRNA), které vytvářejí RISC komplex. Součástí komplexu RISC je nukleáza zvaná Slicer, která po navázání s komplexem RISC rozštěpí cílovou mRNA uprostřed homologní oblasti. Takto rozštěpená mRNA je rozpoznána jako poškozená a je následně odbourána (Djikeng *et al.*, 2001). Tento fenomén slouží pravděpodobně jako obrana proti virům, transpozonům, k regulaci translace, k vypnutí chromatinu (Drozd *et al.*, 2002; Lye *et al.*, 2010). RNAi se využívá jak pro testování funkce genu u buněk v kultuře, tak pro zjištění jejich funkce *in vivo* (Mohr a Perriomon, 2012).

Metoda RNAi se u *T. brucei* využívá pro funkční analýzu genů. Lze zjistit, jestli je studovaný gen důležitý pro životaschopnost buňky, zda se mění její morfologie, metabolismus apod. Pro výrobu dsRNA se využívá vektorů, které jsou homologní rekombinací vloženy do genomu *T. brucei*. Využívají se dva typy vektorů: i./ pLEW100, který má jeden indukovatelný promotor a cílová sekvence se musí za něj zaklonovat dvakrát v invertované poloze (Wirtz *et al.*, 1999) a pT7-177, u kterého jsou dva indukovatelné protisměrné promotory, mezi které je vložena cílová sekvence. Vektory určené pro elektroporaci do *T. brucei* nesou gen pro rezistenci eukaryotického antibiotika, phleomycinu (Wickstead *et al.*, 2002). Vytvořená dsRNA musí být minimálně z 88% homologická s mRNA, aby došlo k úspěšnému vypnutí genu (Ullu *et al.*, 2004). Modifikovaný kmen *T. brucei* 29-13 má v genomu začleněnou virovou polymerázu bakteriofága T7, která přepisuje za pomoci svých promotorů vloženou sekvenci do RNA. K tomu dochází po indukci tetracyklinem. Dále obsahuje gen pro rezistenci na neomycin a hygromycin a tetracyklinový represor *E. coli* (Wirtz *et al.*, 1999).



### 1.3. Mitochondrie

Jedna z nejzajímavějších organel v buňce je bezpochyby mitochondrie, která je přítomna ve všech eukaryotních buňkách. Je obalena dvěma membránami, jednou vnitřní a druhou vnější. Vnější membrána je pórovitá, vnitřní membrána je zprohýbaná a její záhyby směřují dovnitř mitochondrie, kde probíhají nejdůležitější metabolické procesy (Krebsův cyklus, dýchací řetězec atd.) Tyto membrány vytvářejí dva mitochondriální kompartmenty: velký vnitřní zvaný matrix a menší tzv. mezimembránový prostor (Schneider *et al.*, 2001). Mitochondrie je prokaryotického původu, vznikla pohlcením  $\alpha$ -proteobakterie předkem dnešních eukaryotických buněk. Dvě třetiny z 1100 známých proteinů jsou bakteriálního původu, zbytek je eukaryotní inovací. Ve vnitřní membráně mitochondrie se nachází oxidativní fosforylace. Produkce ATP je základní funkcí mitochondrie. ATP je důležité pro většinu buněčných reakcí. Mitochondrie jsou generátory chemické energie pro buňku. Mitochondrie obsahuje vlastní genom, který je kruhový, a má také transkripční a translační systém. Lidská mitochondrie kóduje 13 proteinů, 22 tRNA a 2 rRNA pro translační proces a dědí se po mateřské linii (Vafai and Mootha, 2012). Mitochondrie rozčleňuje reakce a molekuly důležité pro metabolismus, signalizaci a programovanou buněčnou smrt (Okamoto *et al.*, 2005). Většina ostatních proteinů, které jsou pro údržbu a expresi mitochondriální DNA, se nachází kódovány v jádře a jsou poté syntetizovány v cytosolu a postranslačně dopravovány do mitochondrie (Schneider *et al.*, 2001). Jen pár proteinů je produkováno přímo v mitochondrii.

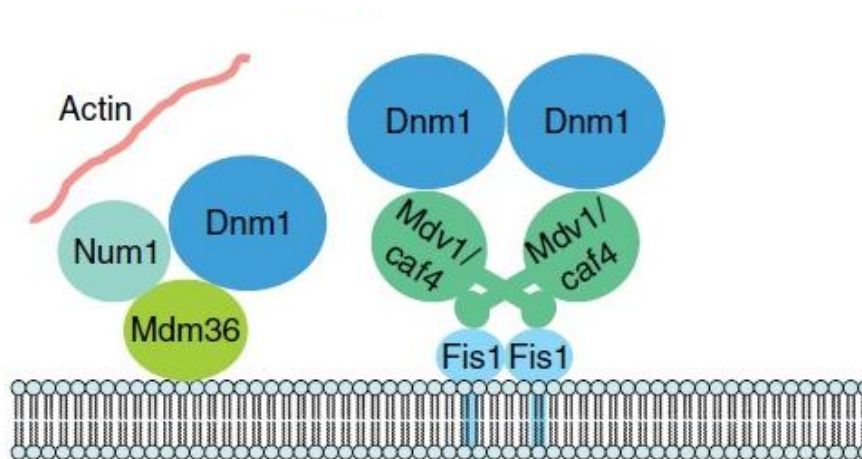
U *Trypanosomy brucei* se vyskytuje pouze jedna mitochondrie táhnoucí se od přední části buňky k zadní. Podle toho, v jaké části životního cyklu se trypanosoma nachází, se mění energetický metabolismus v její mitochondrii. Vzhledem k absenci mitochondriálního dýchání u BF stadia je mitochondrie jednoduchá redukováná tubulární struktura postrádající krystaly. Jelikož se buňka vyskytuje v prostředí bohatém na glukózu, je energie získávána z glykolytické reakce prostřednictvím glykozomu, což je zcela postačující pro růst parazita. PF stadium ve střevě mouchy je charakterizováno velkou mitochondrií s plně funkčním dýchacím řetězcem. Mitochondrie v procyklickém stadiu je z hlediska metabolismu a fyziologie podobná konvenčním eukaryotickým modelovým systémům. (Bochud - Allemann a Schneider *et al.*, 2002; Parson *et al.*, 2004; Lukeš *et al.*, 2010). Rozdělení mitochondrie je synchronizováno s buněčným dělením. Správné dělení mitochondrie je tudíž nezbytné pro vznik nového jedince.

### 1.3.1 Mitochondriální dělení u eukaryot

Mitochondriální dělení se skládá ze dvou cyklů „fission“ a „fusion“ (Okamoto *et al.*, 2005). Tyto dynamické procesy zodpovídají za mitochondriální distribuci a funkci tím, že ovlivňují jejich tvar, počet a velikost (Kageyama *et al.*, 2011). V této práci se zabýváme „fission“ cyklem a právě jemu je věnována pozornost v následující sekci.

V kvasinkách je mitochondriální dělení vícekrokovým procesem, na kterém se podílí řada proteinů. Jako nejdůležitější se ukázal dynamin (Dnm1) protein, který patří do dynamin rodiny Dnm1 obsahuje N-terminální GTPázovou doménu, která vede ke změně konformace v mitochondrii, střední hydrofilní doménu tzv. „inzert B“, u které zatím není známa funkce a C-terminální GTPázovou efektorovou doménu (Otsuga *et al.*, 1998, Okamoto *et al.*, 2005, Kaegyama *et al.*, 2011). Dnm1 tvoří s GTPázou helikální struktury, které jsou důležité k zaškrcení mitochondriální membrány (Bleazard *et al.*, 1999). U zmutované formy Dnm1 bez GTPázy nedochází ke tvorbě helikálních struktur *in vitro* a mitochondrie se nemůže dělit (Naylor *et al.*, 2006). Dnm1 nachází primárně v cytosolu, ale malá část i na vnější mitochondriální membráně. Dnm1 je rekrutován do vnější mitochondriální membrány, kde provádí dělení. Teprve po navázání na protein Fis1 (Fission) dochází k zacílení Dnm1 komplexu na vnější mitochondriální membránu. Fis interaguje přímo s Dnm1 komplexem a je klíčovým hráčem k jeho správnému sestavení (Okamoto *et al.*, 2005). Představuje tedy další nezbytný protein mitochondriálního dělení u kvasinek.

Tento integrální membránový protein je evolučně zachovalý a jeho N-terminální doména zasahuje do cytoplazmy (Okamoto *et al.*, 2005, Mozdy *et al.*, 2000). Skládá se, z 6  $\alpha$ -helikáz, které tvoří útvar zvaný TPR (tetratrikopeptidové repetice), které jsou zodpovědné za proteinové interakce. Pro vazbu Fis1 s Dnm1 je potřeba dalších dvou pomocných proteinů, Mdv1 (mitochondrial divison) a jeho paraloga Caf4 (CC4 associated factor), (Tieu a Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005).



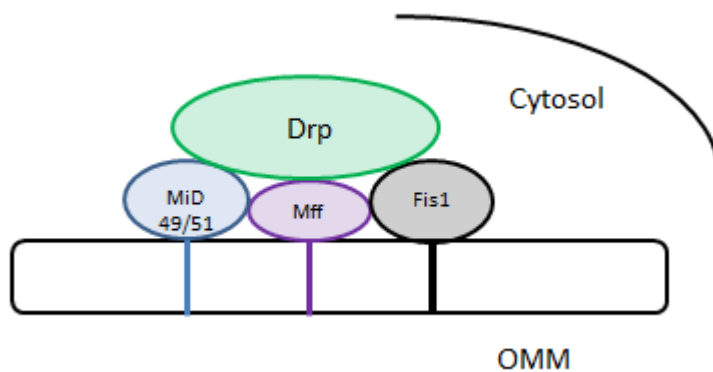
obr. 3: Model mitochondriálního dělení u kvasinek.

Mdv1p a Caf4p se vážou na Fis1p pomocí N-terminálního ramena, prostřednictvím helix-loop-helix motivu, který oba spojí s TPR doménou Fis1p (Zhang a Chan, 2007). Odstraněním N-terminálního ramena dochází k výraznému snížení mitochondriálního dělení u kvasinek (Suzuki *et al.*, 2005). Taktéž „Coiled-coil“ doména Mdv1 se ukázala být důležitým regulátorem interakce s Dnm1. Mdv1p tedy v porovnání s Caf4p hraje důležitější roli v mitochondriálním dělení. (Tieu *et al.*, 2002; Kageyama *et al.*, 2011).

U kvasinek se objevuje ještě další komplex, který stabilizuje a podporuje mitochondriální dělení. Hlavním proteinem komplexu je Num1 (nuclear migration 1), 313 kDa velký protein, umístěný na buněčném povrchu (Farkasovsky *et al.*, 2001, Schauss *et al.*, 2007). Num1p interaguje s Dnm1p, je stabilizovaný Mdm36 a tento komplex je pravděpodobně spojen s cytoskeletálním aktinem. Interakce s cytoskeletem zlepšuje účinnosti mitochondriálního dělení natahováním a smršťováním mitochondriálních tubulů (Kageyama *et al.* 2011). Komplex Num1p – Dnm1p – Mdm36 spolu s aktinem (obr. 4), kde aktinové filamenty transportuje tento komplex do mitochondrie, se ukázalo jako důležitým článkem pro Dnm1p zprostředkované rozdělení mitochondrie (Roux *et al.*, 2006; Boldogh *et al.*, 2006). Pokud chybí Num1 a Dnm1p probíhá dělení pouze za vysokých teplot je utlumeno, ale ne úplně zastaveno (Kageyama *et al.* 2011, Cerveny *et al.*, 2007).

U savčích buněk se nachází homolog kvasinkového Dnm1p, nazvaný dynamin-related protein (Drp1), (Pitts KR *et al.*, 1999). Též byl nalezen homolog Fis1 i lidský Fis1, u

kterého se předpokládala podobná funkce jako u kvasinek (Stojanovski *et al.*, 2004). Velkým překvapením byl výsledek z článku od Otera *et al.* (2010), který ukázal, že savčí Fis1 je postradatelným při rekrutování Drp1. Navíc se zde na rozdíl od kvasinek nevyskytuje žádný homolog Mdv1 a Caf4 proteinů. Hlavní roli pro zacílení Drp1 na vnější mitochondriální membránu hraje nově objevený protein, mitochondriální dělicí faktor, Mff. Na druhé straně neexistuje homolog Mff u kvasinek (Gandre-Babbe a van der Blik, 2008), Pravděpodobně se jedná o přímou interakci. I když Fis1 hraje menší roli než Mff při mitochondriálním dělení, tak při jeho vypnutí v myších embryonálních fibroblastech došlo k jasnému morfologickému fenotypu. Z toho můžeme usuzovat, že záleží zejména na typu buněk (Otera *et al.*, 2010; Losón *et al.*, 2013). Nicméně byla zjištěna slabá interakce mezi Mff a Drp1, což značí, že se zde budou vyskytovat další proteiny, které stabilizují jejich spojení během mitochondriálního dělení. (Kageyama *et al.*, 2011).



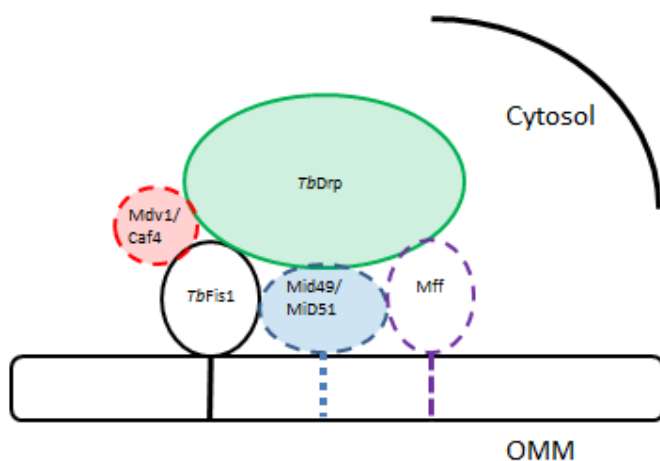
obr.4: Model mitochondriálního dělení u savců

To se ukázalo jako pravdou a v savčím mitochondriálním dělení byly objeveny nové membránové proteiny, MiD 49/51. Tyto proteiny způsobují mitochondriální fragmentaci a natahování a při knock-downu (KD) došlo poklesu Drp1 rekrutovaného do mitochondrie (Palmer *et al.*, 2011). Při absenci jak Fis1, tak Mff dochází k tomu, že Drp1 spojený s mitochondrií je menší a menším počtu. Fis1, Mff, MiD 49-51, každý z nich může hrát roli při rekrutování Drp1 a zlepšovat mitochondriální dělení (Losón *et al.*, 2013).

*Trypanosoma brucei* je vhodným modelovým organismem pro studium mitochondriálního dělení, jelikož má jen jednu velkou mitochondrii a představuje jednu z nejstarších eukaryotických linií (Tyler *et al.*, 2001). Zajímavostí je, že oproti ostatním

eukaryotům se u *T.brucei* nachází jen jeden člen z dynamin rodiny. Pouze před a během cytokineze se mitochondrie dělí na dvě a je přenášena do dceřiných buněk. Mitochondriální dělení musí být synchronizováno s dělením bičíku a možná slouží jako kontrolní bod, který zabraňuje vzniku dceřiných buněk neobsahujících kDNA nebo mitochondrii. K rozdělení buňky dojde až po rozdělení mitochondrie (Chanez *et al.*, 2006). U *T.brucei* existují 2 homology DRP (označené *TbDRP*), které jsou tandemicky spojené a z 97% indentické. Jedná se o velmi konzervovaný protein, který se vyskytuje i u dalších členů z řádu Kinetoplastida (Field a Carrington, 2004; Morgan *et al.*, 2004). *TbDRP* protein je potřebný pro cytokinezi, která je zprostředkována obvykle klasickými dynaminy. Nachází se jak v mitochondrii, tak i ve flagelární kapse, kde dochází k endocytóze. Nedostatek DRP způsobuje pozastavení dělení mitochondrie během cytokineze (McKean *et al.*, 2003).

V této práci jsme identifikovali putativního homologa Fis1 u *T.brucei* (*TbFis1*), označeného Tb.927.10.8660 v databázi Trityp ([www.trityp.org](http://www.trityp.org)). Fis1 většinou obsahuje několik tetratrikopeptidových (TPR) repetic a jednu transmembránovou doménu na C-konci. Na rozdíl od kvasinek a člověka má *T.brucei* jen jeden TPR motiv. TPR motivy jsou zodpovědné za spojení s DRP a transmembránová doména za lokalizaci do mitochondrie (James *et al.*, 2003). Pomocí RNAi jsme zjišťovali, zda má *TbFis1* roli v mitochondriálním dělení u *T.brucei*. Dále jsme se u *T.brucei* snažili identifikovat homology genů, které se účastní mitochondriálního dělení u vyšších eukaryot.



obr. 5: Hypotetický model mitochondriálního dělení u *T. brucei*.

## **2. Cíle práce**

1. Identifikace Fis1 proteinu v *T.brucei*
2. Příprava *TbFis1* RNAi konstruktů
3. Studium morfologických změn v *T.brucei*

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Mapování UTR oblastí u *TbFis1*

#### 3.1.1 Výroba cDNA

Vytvořili jsme cDNA přepisem mRNA do DNA pomocí reverzní transkriptázy (podle protokolu od Invitrogen), kde jsme použili sekvenci trikant (Fedič *et al.*, 2003), která obsahuje oligo dT, která je komplementární k poly A.

Vytvoření cDNA program:

1. Denaturace	94°C 30 sekund	
2. Nasedání	52°C 30 sekund	} 30x
3. Polymerace	72°C 30 sekund	

#### 3.1.2. Nested PCR

Vytvořenou cDNA jsme použili jako templát k 1. PCR, kde jsme použili fw primer komplementární k spliced leader (SL) sekvenci (Shaked *et al.*, 2010), která se u *T. brucei* vyskytuje na 5' konci každé mRNA. Rv primer jsme navrhli uvnitř otevřeného čtecího rámce (ORF) *TbFis*. PCR produkt této reakce o velikosti 485 bp byl následně použit jako templát pro druhou PCR (nested PCR), kde jsou oba primery posunuty více dovnitř navržené oblasti za účelem zvýšení specifity reakce. U mapování 3'UTR jsme přidali tzv. adaptor, což je specifická sekvence, která je tímto postupem přidaná na 3' konec každé reverzně přepsané mRNA. Fw primery jsme navrhli uvnitř ORF *TbFis* a rv primery mají adaptorovou sekvenci. Udělali jsme první PCR reakci, kde jsme dostali produkt o velikosti 457 bp a následně použili pro druhou PCR, stejně jako v 5' UTR.

Program pro 5' a 3' UTR:

1. Denaturace	94°C 2 min.	
2. Denaturace	94°C 20 sek.	} 30x
3. Nasedání primerů	52°C 20 sek.	
4. Polymerace	72°C 1 min.	

5. Polymerace

72°C 7 min.

Tab.I.: Primery pro mapování UTR oblastí.

UTR oblast	Název primeru	PCR	Sekvence	Velikost produktu (bp)
5'	SL fw1	1	AACTAACGCTATTATTAGAACAGTTTC	485
	ORF rv1		CCTCTCTGACCGTATTTACC	
	SL fw2	2	TATTAGAACAGTTTCTGTACTATATTG	403
	ORF rv2		CCGAAGAAACAAGCTGT	
3'	ORF fw1	1	GCAAGCATGCAAAATTGAAGA	457
	trikant rv		TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA	
	ORF fw2	2	CTGCTTCTCCGAATTTGCAA	407
	trikant rv		TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA	

Tab.II: 5' a 3' UTR PCR reakce.

Fw primer 10 µM	2 µl
Rw primer 10 µM	2 µl
PCR pufr 10x	5 µl
dNTPs 10 µM	1 µl
Taq polymeráza	0,5 µl
templát	1 µl
miliQ H <sub>2</sub> O	38,5 µl

Po PCR ampifikaci proběhla ligace do TOPO vektoru podle protokolu TOPO TA Cloning (viz. 2.2.5).



## 3.2. Příprava RNAi konstruktů

### 3.2.1. Primery pro PCR amplifikaci

Primery (krátká oligonukleotidová DNA) byly navrženy pomocí NCBI Primer-BLAST se standardním nastavením (tab.III) viz: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)

Tab.III: Navržené primery pro gen TbFis1

Název primeru	Sekvence
TbFis1 PCR Fw	<u>GGATCC</u> GAAGATAAAACCGTTGCAG
TbFis1 PCR Rv	AAGCTT <u>CTGGGGG</u> TCCTTATCAAATCAC

Restrikční místa jsou vyznačena podtržením.

U TbFis1 Fw primeru bylo přidáno BamHI restrikční místo.

U TbFis1 Rv primeru bylo přidáno HindIII restrikční místo.

### 3.2.2 Polymerázová řetězová reakce

#### Princip:

Jedná se o rychlou a snadnou metodu, která slouží k namnožení DNA za pomoci replikace nukleových kyselin. Místa pro namnožení jsou ohraničena na začátku a na konci tzv. primery.

#### Postup:

Reakce probíhala v 50  $\mu$ l (viz tab.IV)

Tab.IV: PCR reakce pro amplifikaci TbFis1 RNAi fragmentu.

Fw primer 10 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
Rw primer 10 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
PCR pufr 10x	5 $\mu$ l
dNTPs 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Taq polymeráza	1 $\mu$ l
templát cDNA (109 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
miliQ H <sub>2</sub> O	37 $\mu$ l

Program:

1. Denaturace	96°C 5 min.	
2. Denaturace	94°C 1 min.	} 30x
3. Nasedání primerů	55°C 1 min.	
4. Polymerace	72°C 1,5 min.	
5. Polymerace	72°C 10 min.	

### 3.2.3 Kontrola PCR amplifikace

Poté se zkontrolovala velikost bandu na 1% agarozovém gelu z 1g agarózy a 100 ml TAE (2 M Tris, 5,71 % kyselina octová, 5 mM EDTA pH 8), který jsme poté zahřáli v mikrovlnné troubě, zchladili a poté přidali 1  $\mu$ l Ethidium bromidu (5 mg/ml) a následně nechali ztuhnout. Poté jsme napipetovali na gel 8  $\mu$ l DNA markeru a 2  $\mu$ l PCR reakce smíchané s 0,4  $\mu$ l Loading Dye pro zkontrolování velikosti proužku na gelu. Zbytek PCR reakce jsme přečistili pomocí kitu PCR clean-up od Sigmy.

### 3.2.4 Ligace do TOPO vektoru

**Princip:**

Rychlá ligace (kolem 5 min.) nastala pomocí linearizovaného vektoru s 3'-T overhangy aktivované topoizomerasou, kdy specificky kovalentně váže na 3-OH skupinu posledního T konzervativní sekvence CCCTT a vytváří fosfodiesterovou makroergickou vazbu s 3'-A overhangy PCR produktu a vytváří aktivovaný plazmid.

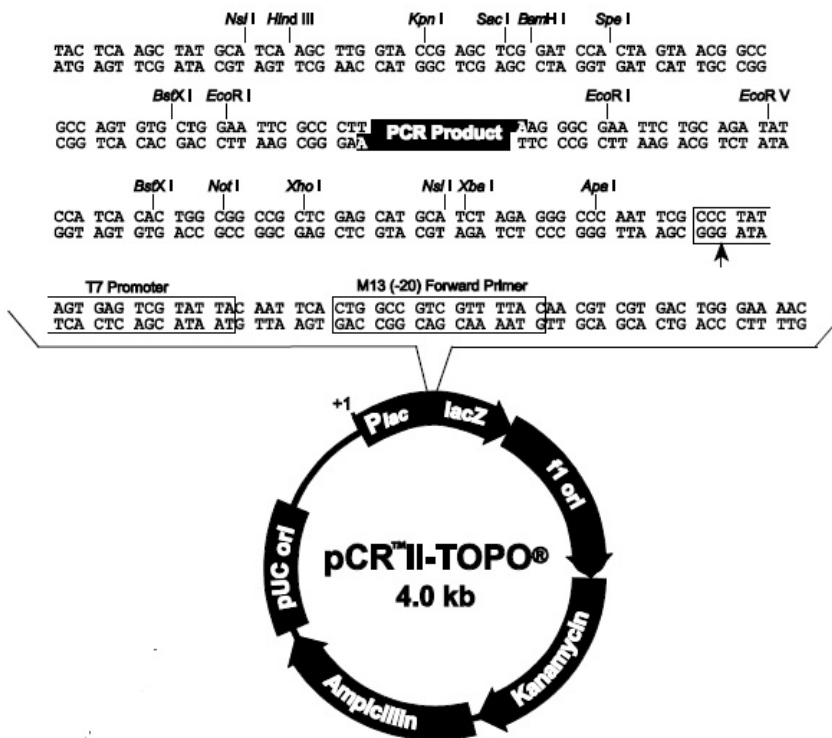
**Postup:**

Reakce proběhla podle protokolu TOPO TA Cloning od firmy Invitrogen (tab.V).

Tab.V: Ligační reakce.

PCR produkt	4 $\mu$ l
Salt solution	1 $\mu$ l
TOPO vektor	1 $\mu$ l

Reakci byla inkubována po 5 minut. Poté byla použita k transformaci do *Escherichia coli*.



Obr. 6: Mapa TOPO vektoru s restričními místy.

### 3.2.5. Transformace do *E. coli*

#### Princip:

Při transformaci se využívají kompetentní buňky, které mají zvýšenou schopnost přijímat DNA. Pohyb molekul DNA do kompetentních buněk probíhá při teplotě 42°C. Uvnitř buňky se plazmidová DNA množí a produkuje nové identické kopie.

#### Postup:

Pro transformaci do *E. coli* byly použity kompetentní buňky (XL-1 blue *E. coli*), které po dobu cca 10 minut postupně rozmrzávaly. Poté bylo užito 2 µl ligační reakce k 50 µl buněk. Tato reakce byla 20 minut ponechána na ledě, poté dána na 42 vteřin do vodní lázně (předehřáté na 42°C). Při této teplotě došlo k teplotnímu šoku nutného pro transformaci do *E. coli*. Po tomto šoku byly opět ponechány na 2 minuty na ledě, k nim bylo přidáno 250 µl sterilního SOC (2 % trypton, 0,5 % kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukózy). Po tomto kroku jsme reakci nechali třepat 1 hodinu v 37°C v třepačce.

Mezitím jsme si připravili ampicilinové misky, ke kterým jsme přidali 35  $\mu\text{l}$  X-galu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid) a 5  $\mu\text{l}$  IPTG (isopropylthio- $\beta$ -galaktosid) pro modrobílou selekci. Modrobílá selekce je způsob, kterým lze orientačně rozlišit kolonie bakterií obsahující plazmid s vloženou cizí DNA od kolonií, které obsahují pouze intaktní plazmid bez vložené cizí DNA. Systém je založen na aktivitě enzymu beta-galaktosidázy. Tento enzym štěpí fyziologicky disacharid galaktózu na laktózu a glukózu. V laboratorních postupech lze využít pro sledování aktivity tohoto enzymu umělý substrát, tzv. X-gal. Tento substrát je bezbarvý, ale jeho štěpením vzniká modrý produkt. Přidáme-li X-gal do živné půdy (agaru na Petriho misce) a na tuto půdu naočkujeme bakterie, obsahující funkční beta-galaktosidázu, budou z média získávat X-gal, štěpit ho a jejich kolonie se zbarví zřetelně modře. Pokud nebudou obsahovat beta-galaktosidázu, zůstanou krémově bílé. Vzniklou reakci jsme po transformaci natřeli na tyto misky a nechali inkubovat 16 hodin po 37°C.

### 3.2.6. Izolace plazmidové DNA

Izolace DNA byla provedena podle kitu QIAprep Spin Miniprep Kit od Qiagen. Vybraná bílá kolonie (obsahující vektor s naším inzertem) byla dána do 3 ml LB media (1 % trypton, 1 % NaCl, 0,5 % kvasný extrakt) a k tomu bylo přidáno 12  $\mu\text{l}$  ampicilinu (4  $\mu\text{g/ml}$ ). Kultura byla ponechána 15 hodin v 37°C třepačce.

### 3.2.7. Restrikční analýza

Reakci jsme provedli za pomoci restrikčního enzymu *EcoRI* v 20  $\mu\text{l}$  (Tab.VI).

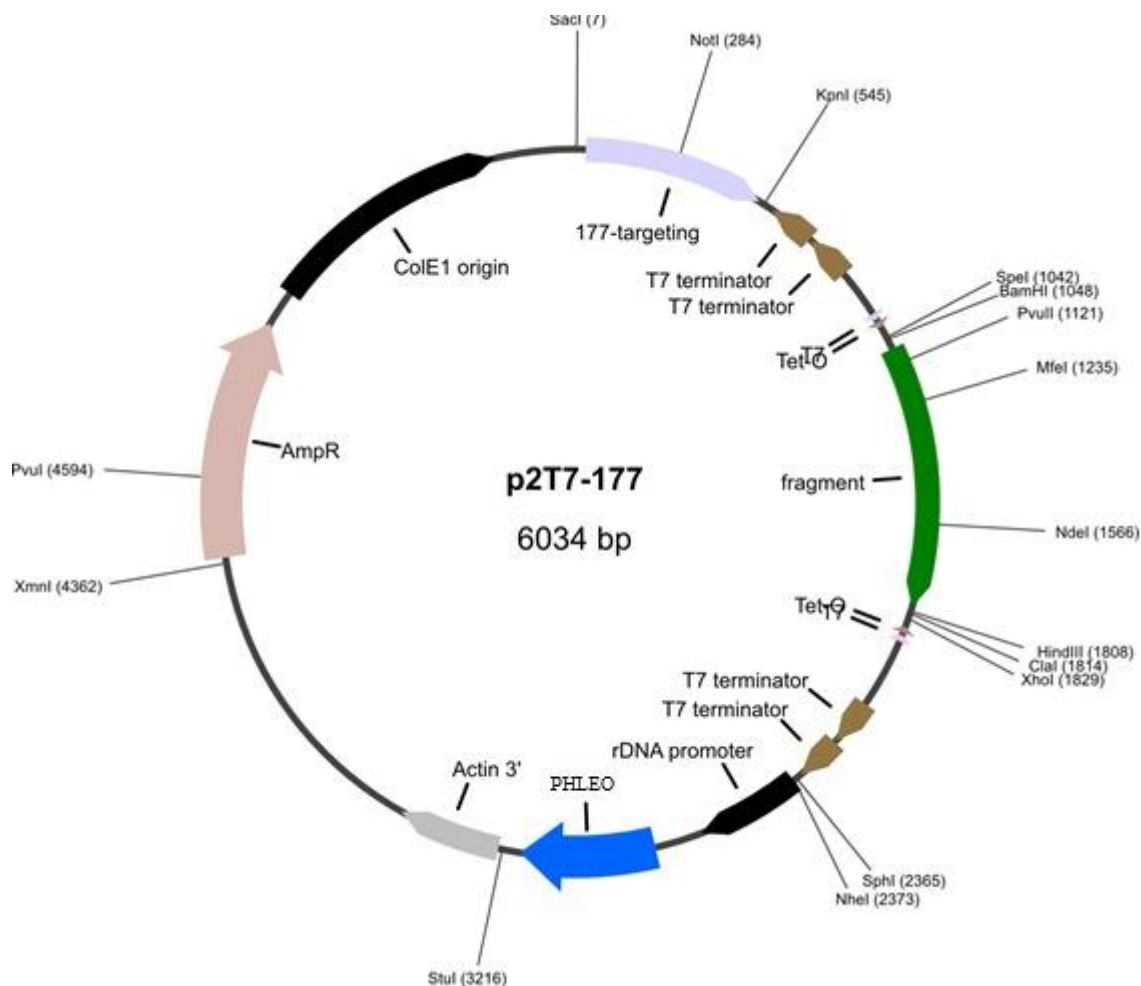
Tab VI.: Restrikční reakce

Enzym <i>EcoRI</i>	1 $\mu\text{l}$
10x <i>EcoRI</i> pufr	2 $\mu\text{l}$
miliQ H <sub>2</sub> O	3 $\mu\text{l}$
Templát	14 $\mu\text{l}$

Reakce se dala na 1 hodinu do 37°C boxu. Po uplynutí této doby jsme výsledek ověřili na 1% agarozovém gelu.

### 3.2.8. Ligace do p2T7 – 177 plazmidu

Pro překlonování našeho s inzertu (*TbFis1*) z TOPO vektoru jsme zvolili P2T7 – 177 plazmid (obr.7).



Obr.7: Mapa p2T7 – 177 plazmidu s restrikčními místy (Wickstead *et al.*, 2002).

Nejprve jsme naštipali p2T7 – 177 plazmid pomocí restrikčních enzymů *BamHI* a *HindIII* (Tab. VII). To samé jsme provedli pro TOPO – *TbFis1* RNAi fragment (Tab.VIII). Reakce proběhla v 30  $\mu$ l.

Tab.VII: Restriční reakce P2T7 – 177.

Enzym BamHI	1 $\mu$ l
Enzym HindHIII	1 $\mu$ l
Pufr 10x NEB 2	3 $\mu$ l
BSA	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16,8 $\mu$ l
P2T7 – 177 plazmid	8 $\mu$ l

Tab.VIII: Restriční reakce TOPO – TbFis1 RNAi fragment.

BamHI	1 $\mu$ l
HindHIII	1 $\mu$ l
Pufr 10x NEB 2	3 $\mu$ l
BSA	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	18,7 $\mu$ l
TOPO – TbFis1	6 $\mu$ l

Reakce jsme nechali na 2 hodiny v 37°C boxu a poté ověřili na 1% agarozovém gelu, kde jsme dostali očekávanou velikost a poté jsme je z gelu vyřízli podle protokolu QIAquick Gel Extraction od Qiagen a následně udělali ligační reakci pro TbFis1 a kontrolu. (tab.IX). Pro transformaci bylo použito 5  $\mu$ l ligační reakce, která proběhla stejně jako předtím (viz. 2.2.6), úspěšné zaklonování bylo ověřeno pomocí restriční analýzy a sekvenováním. Sekvenování probíhalo za pomoci komerčních PCR primerů T7 a SP6.

Tab.IX: Ligace reakce TbFis1 RNAi do p2T7 – 177 plazmidu a kontrola.

	Ligace	Kontrola
Vektor	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Inzert	7,5 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Pufr 5x	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
T4 ligáza	0,1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	0 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l

### 3.2.9. Linearizace p2T7 – 177 plazmidu

#### Princip:

Jelikož plazmid obsahuje kruhovou DNA, je třeba ji zlinearizovat, aby se homologní rekombinací mohla začlenit do lineárního genomu *Trypanosomy brucei*. Toho se docílí pomocí restrikčního enzymu NotI, který štípe v oblasti minichoromozů 177.

#### Postup:

Celkově bylo naštípáno 10 µg DNA v 200 µl (tab.X)

Tab.X: Linearizační reakce P2T7 -177 plazmidu.

NotI	10 µl
BSA	2 µl
Pufř 10x NEB 3	20 µl
templát	74 µl
miliQ H2O	94 µl

Reakce proběhla hodinu v 37°C boxu, po uplynutí této doby byl produkt přečištěn 50 µl 10M octanu sodného a 2,5 x objem 96% etanolu, což je 625 µl. Poté byla ponechána 20 minut v -20°C. Reakce byla stočena a pelet byl promyt 70% etanolem. Na konci byl pelet vysušen vzduchem a smíchán s 400 µl sterilním cytomixem.

### 3.2.10. Elektroporace P2T7 – 177/ TbFis1 RNAi plazmidu do genomu procyklických stadií *T.brucei*

Elektroporace se využívá pro začlenění vybraného genu v linearizovaném plazmidu do genomu *T.brucei* za pomoci elektrického šoku. Pro úspěšnou elektroporaci je třeba připravit sterilní elektroporační roztok cytomix (Tab.XI).

Tab.XI: Reakční směs pro cytomix.

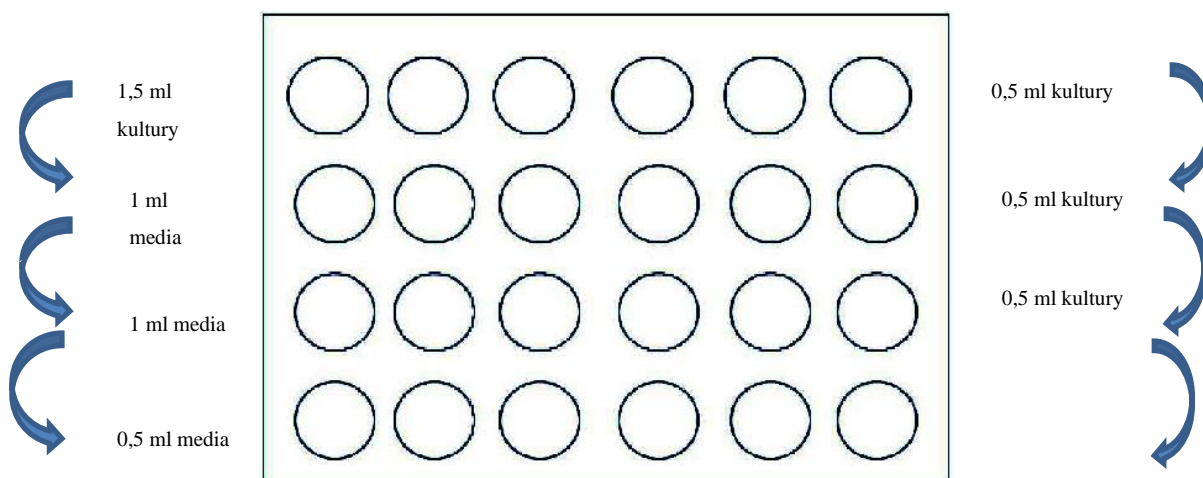
Cytomix	Množství pro 50 ml cytomixu
25 mM HEPES (pH 7,6)	625 µl
120 mM KCl	6000 µl
0,15 mM CaCl <sub>2</sub>	7,5 µl
10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,6)	500 µl
2 mM EDTA	200 µl

6 mM Glukóza	300 $\mu$ l
5 mM MgCl <sub>2</sub>	250 $\mu$ l
miliQ H <sub>2</sub> O	42 120 $\mu$ l

Pro elektroporaci byl použit kmen 29-13 *T.brucei*, který byl 3 dny před elektroporací pravidelně ředěn na optimálních  $2 \times 10^6$ . Poté bylo sklizeno 10 ml  $2 \times 10^6$  pomocí centrifugace při 1 300 g v 4°C. Pelet byl promyt v 5 ml cytomixu a centrifugován při 700 g po dobu 10 minut. Poté byl pelet resuspendován v 400  $\mu$ l cytomixu s přidaným *TbFis1* RNAi. Tato vzniklá směs byla napipetována do kyvet. Elektroporace proběhla za užití dvou elektrických šoků v přístroji ECM650 (BTX) za nastavení: 1. 1600 V, 25  $\Omega$ , 50  $\mu$ F, 10s, 2. 1700 V, 25  $\Omega$ , 50  $\mu$ F. Buňky nakonec byly resuspendovány v 10 ml mediu hygromycin (H) o koncentraci 50 mg/ $\mu$ l a G418 (G) o koncentraci 15 mg/ $\mu$ l a následně inkubovány v 27°C na 18 hodin.

### 3.2.11 Selekcce pomocí antibiotik

Do transformovaných buněk (*TbFis1* RNAi) bylo přidáno 2,5  $\mu$ g/ml phleomycinu (P). Buňky byly rozděleny do 24 jamek a to tak, že prvním řádku bylo napipetováno 1,5 ml kultury. Do druhého a třetího řádku bylo přidáno po 1 ml SDM-79 média a do čtvrtého bylo přidáno 0,5 ml SDM-79 média. Buňky byly ředěny tak, že z 1. řádku se napipetovalo 0,5 ml kultury a dalo do druhého řádku, kde se směs promíchala pomocí pipety. Poté se z 3. řádku opět napipetovalo 0,5 ml kultury a dalo do 4. řádku (obr. 8). Miska s jamkami byla uchována ve 27°C stupních, dokud nebyla dokončena selekce a nebyla stabilizována buněčná linie.



obr.8: Ředění elektroporovaných buněk do 24 jamkové misky.



### **3.3. Kultivace procyklických stadií *T.brucei***

Kultivace procyklických stadií (PF) proběhla v SDM-79 mediu ve 27°C (Brun and Schonenberger, 1979). Pro divoký kmen bylo použito médium ošetřené antibiotiky H (50 µg/ml) a G (15 µg/ml), pro stabilní transformované buňky bylo použito médium s H, G a navíc P (2,5 µg/ml). Pro indukci RNAi fragmentu byl použit tetracyklin o koncentraci 1 µg/ml.

### **3.4. Northern blotting analýza**

#### **Princip:**

Northern blotting je základní metoda molekulární biologie, která se používá ke studiu genové exprese, pomocí níž se dá určit hodnota úrovně genové exprese konkrétních mRNA. Metoda je založena na vzájemné hybridizaci jednovláknových komplementárních molekul mRNA a DNA za vzniku dvouvláknové molekuly.

#### **Postup:**

Nejprve je celková RNA denaturována a poté dělena podle velikosti na agarózovém gelu. RNA je pak přenesena na membránu, imobilizována UV zářením a hybridizována s radioaktivně značenou DNA sondou. Detekce specifického signálu je prováděna pomocí autoradiografických technik.

#### **3.4.1. Indukce *T.brucei***

RNAi buněčné linie byly narostlá na  $2 \times 10^6$  v objemu 10 ml a část kultury byla indukována tetracyklinem (1 µg/ml). Buňky byly centrifugovány (1300 g) po 48 hodinách. Výsledný pelet byl resuspendován v 1 ml RNA Blue (TopBio, Czech Republic).

#### **3.4.2. RNA izolace**

##### **Princip:**

Buňky jsou lyzovány v RNA Blue při zachování integrity RNA, DNA i proteinů. Přidání chloroformu a centrifugace vedla k separaci vzorku do tří fází: 1. vodní fáze, obsahující RNA, 2. interfáze, obsahující proteiny a 3. organické modře zabarvené fáze, obsahující DNA. RNA je izolována z vodní fáze precipitací isopropanolem.

## Postup:

Ke každému vzorku s RNA blue bylo přidáno 200  $\mu$ l chloroformu a ponecháno na 2 minuty při pokojové teplotě. Buňky byly centrifugovány po dobu 15 min při 9 750 g v 4°C. Poté byla odebrána vrchní vrstva do nových zkumavek, k nim bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu a ponecháno na 10 min při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byly vzorky opět centrifugovány a vzniklý supernatant odstraněn. K peletu se přidalo 1 ml 75% ethanolu a následně centrifugovány stejným způsobem. Pelet byl poté resuspendován v 50  $\mu$ l miliQ H<sub>2</sub>O a inkubován při 60°C na 10 minut. Výsledná koncentrace RNA byla změřena spektrofotometricky na Nanodropu (Thermo Scientific).

### 3.4.3 RNA gelová elektroforéza

Byl připraven 1% gel, který obsahoval 6,7% formaldehydu a 1x MOPS pufr (tab.XII-XV). K vzorkům a RNA markeru bylo přidáno stejné množství 1,5x sample pufru a inkubováno po dobu 10 minut v 65°C. Vzorky byly separovány 3 hodiny při 90 V. Každých 30 minut byl promíchán pufr. Po dokončení elektroforézy byl gel zkontrolován pod UV.

Tab.XII: Směs na výrobu 1% RNA gelu.

<b>RNA gel (1%) 100ml</b>	
10X MOPS	10ml
agaróza	1g
miliQ H <sub>2</sub> O	72ml
po ochlazení přidat 18ml 37 % formaldehydu	

Tab.XIII: Směs na výrobu Running pufru.

<b>Running pufr</b>	
10X MOPS	50 ml
miliQ H <sub>2</sub> O	450 ml

Tab.XIV: Směs na výrobu Sample pufru.

<b>1,5X Sample pufr</b>	
formamid	600 $\mu$ l
Formaldehyd	210 $\mu$ l
10X MOPS	156 $\mu$ l
ethidium bromid	5 $\mu$ l

Tab.XV: Směs na výrobu 10x MOPS.

<b>10X MOPS</b>	
0,5 M MOPS	40 ml
3 M NaO Acetate	1,67 ml
0,5 M EDTA pH8	2 ml
miliQ H <sub>2</sub> O	56,3 ml

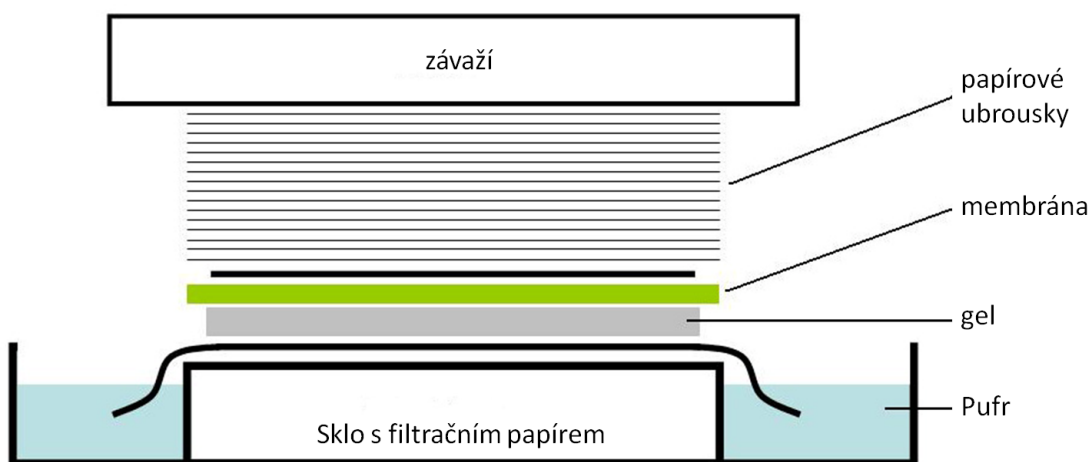
#### 3.4.4. RNA blot

##### Princip:

Gel se přitlačí na membránu a dojde k přenosu RNA z gelu na membránu prostou difuzí.

##### Postup:

Nastříhali jsme si 4 tenké filtrační papíry (11x9 cm) a 1 na sklo (30x22 cm) a ustříhali si membránu (11x9). Northern blot aparatura byla sestavena podle obrázku č. 9. Pro lepší držení papíru k membráně bylo využito 5x SSC a pomocí silného tisknutí byly vytlačeny bublinky. RNA byla přenesena na membránu přes noc a poté imobilizována na membráně pomocí UV crosslinking (UV Stratalinker, Stratagene).



Obr.9: Blotovací aparatura.

#### 3.4.5 Membránová pre-hybridizace

Membrána byla pre-hybridizována v Na-Pi (fosfátosodném pufru) po 2 hodiny při 60°C.

### 3.4.6 Radioaktivní značení

#### Princip:

Radioaktivní značení probíhá radioaktivními izotopy ( $P^{32}$ ). Pomocí X- ray se pak detekuje tento signál.

#### Postup:

Radioaktivní značení bylo podle protokolu HexaLabel DNA labelling Kit (Fermentas), kdy bylo použito 100 ng čistého PCR produktu jako templát. Proba byla vyčištěna stočením a poté vyhřátá na 100°C po 3 minuty. Proba je přidána do 5 ml Na-Pi a inkubována s membránou při 55°C přes noc.

### 3.4.7 Promývání membrány

Hybridizační roztok byl vylit z válce a byl nahrazen promývacím roztokem (0,2x SSC + 0,1% SDS) a inkubován při pokojové teplotě 20 minut. Roztok byl vylit a opět promyt při teplotě 55°C po dobu 20 minut. Poté byla membrána zabalena do folie a vložena do kazety přes noc. Další den byly vyvolány výsledky na přístroji Typhoon Phosphoimager (Amersham).

## 3.5. Kvantitativní Real – time PCR (qPCR)

#### Princip:

qPCR se nejčastěji používá pro velmi přesnou detekci a kvantifikaci mRNA. To buď relativně (poměry koncentrací mezi různými vzorky, tj. 1x, 3x, 7.5x, atd.), nebo absolutně (tj. přesnou hodnotu koncentrace templátu, na základě znalosti koncentrace standardu). Detekce produktu probíhá pomocí SYBR green fluorescenční barvičky vázající dsDNA. Úroveň fluorescence úměrná množství DNA v reakci a to umožňuje přesně zjistit množství produktu během každého jednotlivého kroku. Pro normalizaci kvantifikace v grafech se používají housekeeping geny. Výsledkem pozorování je logaritmický graf změny fluorescence v závislosti na počtu amplifikačních cyklů.

#### Postup:

Nejprve je třeba izolovat RNA, převést RNA na cDNA reverzní transkriptázou a poté můžeme provést kvantitativní měření.

### 3.5.1. RNA izolace

Proběhla podle stejného postupu jako u metody Northern blot (viz 4.3.2).

### 3.5.2 Ošetření RNA DNAázou.

Je důležité použít DNAázu pro zbavení se veškeré DNA před vytvořením cDNA z RNA. Bylo použito 10 µg RNA, která byla smíchána s 1U TURBO DNase (Ambion) a 10x pufr v 50 µl reakci. Reakce byla inkubována 30 minut v 37°C. Ještě více jednotek TURBO DNase bylo přidáno do každé reakce a inkubováno dalších 30 minut, vzorky se pak inkubovaly 2 minuty při normální teplotě s 10 µl inhibičního roztoku DNase. Směs se stočila po 2 minuty při 5850g a stejný objem supernatantu byl přepipetován z každého vzorku do nových zkumavek. Směs 300 µl 96% etanolu, 5 µl 3M acetátu a 1 µl glykogenu byla přidána do každé zkumavky a ponechána přes noc v -80°C k precipitaci. Vzorky byly centrifugovány při 13200 rpm, při 4°C po 20 minut, poté byl vylit supernatant, RNA byla promyta v 70% etanolu a stočena za stejných podmínek po dobu 10 minut. Etanol byl odstraněn a RNA vysušena vzduchem. Zvolený objem vody pro resuspendaci byl určen tak aby koncentrace RNA byla 1 µg/µl. Kvalita RNA byla zkontrolována na denaturačním formaldehydovém gelu.

### 3.5.3 Tvorba cDNA

Z RNA získáme cDNA pomocí reverzní transkriptázi (použit stejný program jako v 3.1.1.). Vytvořili jsme tři skupiny, první označená RT+ (obsahuje reverzní transkriptázu), která se dále dělila na A a B a třetí RT- (bez reverz. transkriptázy) slouží jako negativní kontrola. Nejprve jsme do každé zkumavky připravili 250 ng/µl Random Hex primers a 4 µl 2,5 mM dNTPs. Každá zkumavka obsahovala ještě 5 µg RNA, tuto reakci jsme dali to PCR přístroje na 5 min na 55°C a po uplynutí této doby vyndali. Přitom jsme si připravili reakční směs pro RT+ a RT- (Tab.XVI).

Taxovi.: Reakční směs pro RT+ a RT-.

Chemikálie	RT+	RT-
5x FS pufr	4 µl	4 µl
0,1 M DTT	1 µl	1 µl
RNase out	1 µl	1 µl
Superscript III	1 µl	-
MiliQ H2O	3 µl	4 µl

A a B bylo napipetováno RT+ a do kontrolní RT-. Reakce byly vráceny zpět do PCR přístroje za programu: 5 min v 25°C, 60 min 50°C, 15 min v 70°C. Poté byly vzorky napipetovány do celkového objemu 200 µl.

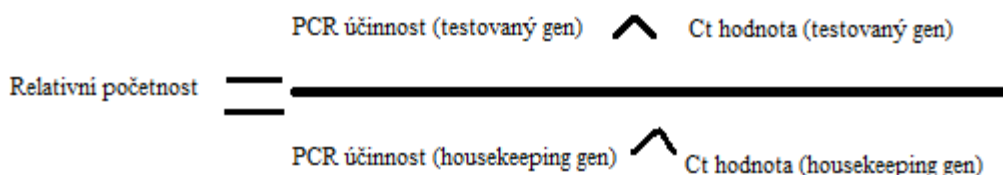
### 3.5.4 qPCR reakce

Každá reakce byla udělána 3x a v reakci 20 µl obsahující 2 µl cDNA, 10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) a 0,3 µl (c= 100 µM). Primery navržené pro qPCR byly vytvořeny v NCBI primer blast a obsahovali HPLC purifikaci (Tab.XVII). Primery jsou vyznačeny na mRNA sekvenci v kapitole 2.1 mapování TbFis1.

Tab.XVII: Navržené primery pro qPCR reakci.

Jméno primeru	Sekvence
TbFis1 qPCR FW	5'CGTGGAATCGGGTGTCCGGC
TbFis1 qPCR RW	5'TGGAGTTGCGCGTGGGTTGG

Z housekeeping genů byly vybrány pro normalizaci kvantifikaci 18S rRNA a β-tubulin a cDNA musela být naředěna 50x. Vzorky byly umístěny do Rotor-Gene RG 3000 (Corbett Research) s následujícím programem: 2 min. při 50°C, 10 min. při 95°C, (15s při 95°C, 60s při 60°C) se 40x opakováním, tání: 60°C-> 95°C s 1 stupeň/krok zvýšením, první krok trval 45s, následující 5s každý. Při prvním běhu je početnost housekeeping genů počítána ve všech a až poté je počítán úroveň indukované a neindukované cDNA, která je srovnávána a pár s nejbližší Ct hodnotou je vybrán pro další experimenty. Pro relativní početnost byla použita Pfaffl metoda (Pfaffl, 2001). Error bary byly vypočítány za použití dat získaných pro triplikáty, ve kterém byla každá reakce udělána. Vzoreček je ukázán na obrázku č. 10.



Obr.10: Pfaffl model.

Relativní početnost = udává relativní změnu exprese (násobek změny exprese cílového genu mezi testovaným a kontrolním vzorkem).

Ct hodnota = cyklus amplifikace, ve kterém hodnota fluorescence reakce překoná prahovou fluorescenci.

### **3.6. Růstové křivky**

#### **Princip:**

Růstová křivka je metoda využívána k porovnání růstu buněk *T. brucei*, ve kterých byla indukována RNAi a buněk, které nebyly indukovány. Pokud je růst v indukovaných buňkách potlačen, či zcela zastaven, je daný gen považován za esenciální.

#### **Postup:**

Buňky mají na začátku koncentraci  $2 \times 10^6$ . Jejich koncentrace byla měřena každý den přístrojem Beckman Coulter Z2 Particle po dobu 10 dní. Buňky byly změřeny a opět naředěny na  $2 \times 10^6$  každé dva dny. Celkově byly počítány 2 buněčné RNAi linie, dva indukované a dva neindukované vzorky.

## 4. Výsledky

### 4.1. Fylogenetická analýza

#### 4.1.1. Fis alignment

Pro *TbFis1* gen, Tb.927.10.8660 nalezený v databázi Trityp ([www.trityp.org](http://www.trityp.org)), jsme hledali podobné geny u dalších eukaryot pomocí programu BLAST v NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Z vybraných organismů byl sestaven alignment s vyznačenými konzervovanými místy (obr.11).

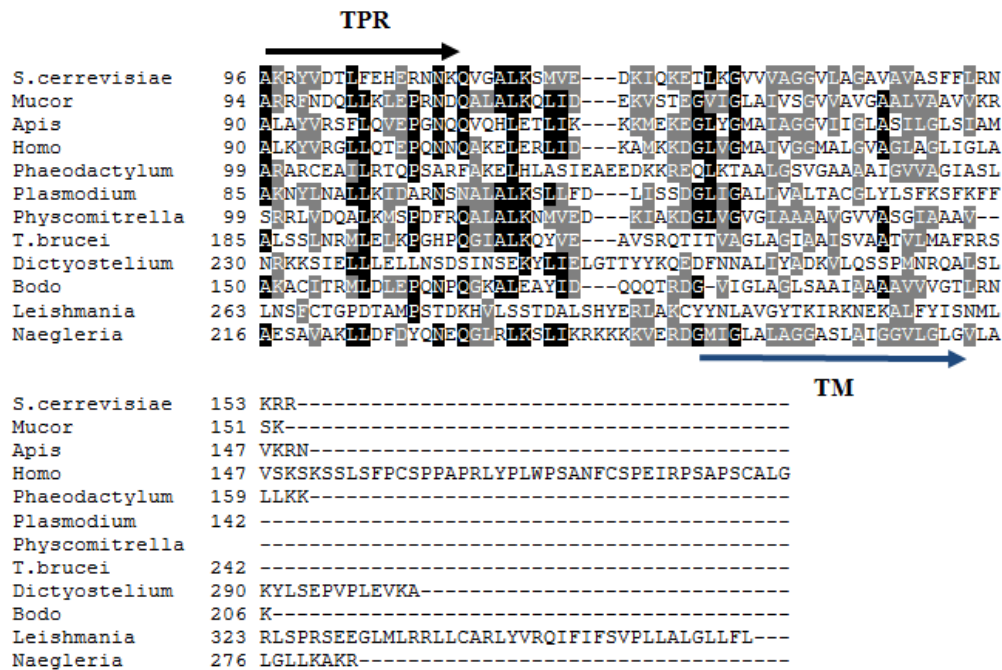
```
S.cerrevisiae      1  -----
Mucor             1  -----
Apis              1  -----
Homo              1  -----
Phaeodactylum  1  -----
Plasmodium       1  -----
Physcomitrella   1  -----
T.brucei         1  -----
Dictyostelium    1  -----
Bodo              1  -----
Leishmania       1  MFTASGPRVNRPDLAEPASFFREALQILRSEDOPYMSITHPSTEQVDYLVNGLKCLRQLD
Naegleria        1  -----
```

```
S.cerrevisiae      1  -----
Mucor             1  -----
Apis              1  -----
Homo              1  -----
Phaeodactylum  1  -----
Plasmodium       1  -----
Physcomitrella   1  -----
T.brucei         1  -----
Dictyostelium    49  KSKKREKEIDDNFRTGNPQYSDFVENNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Bodo              1  -----
Leishmania       61  GGVEATGDKTAYELAVALLWHSDTSLIEEGVQLMEYLLKERWDQYWSTAICSRPAAVG
Naegleria        42  NSSQLQIETTSISNDNLIDPTIQSPLINGYDXYFNSVDYKNTTTIVDNNMETHHARK
```

```
S.cerrevisiae      1  ----MTKVDFWPTKDAYEP---LYPQQLERIRROQVVEGGPTAIIQSREFNYANGLIKST
Mucor             1  ----MKSQSTPLIQDAEIP---LSPAELEVERRQYIKEG-EYVVIQTKENYANGLVKSS
Apis              1  ----MEDVLEEVVSS---DDLKKEFRLYNEQLRSS--VIYQKQAFYANGLVRSK
Homo              1  ----MEAVDNELVSV---EDLLKFEKKEKQSEKAAG--SVSKSTQPEYANGLVRSK
Phaeodactylum  1  ----MGETKATQKEVRDEWERKLALSAPSRERLEELALACAKEDPLATEQYAFALSKSS
Plasmodium       1  ----DPSPEFLKIELERVKSDYENELSDVHVMKPTQEDYACMLICSS
Physcomitrella   1  ----DKIENFFGGGYLPWIDSEMIASCELEASCEKAAAPSENTE SVMRLSIALVHSR
T.brucei         5  SELMDEFFKDPDPTRRMSPCLDELHGLDPAARRVGHKHS LDPNNQDVTREYATVLISH
Dictyostelium    109  NNNINVVNNKSKKHHRHHHHHHHNNHNNHNNHNDKESIDNDFTNNNNNNNNNIDNI
Bodo              9  SRGADLLFKKDPREALPHSPDDLDGLDHSANLRGPSGTAAP-ELVQYSAALISHV
Leishmania       121  DDQDEHGEAVRSQVVESEPDDEDRDDGEWVDIFGSPAEGQCVNLS CNAVAHPCSAHRTS
Naegleria        102  LDRNDEDEYLDLFLEKSLEEQKFITSDMIESAELLETSSNEKERAQSSETLAAILYVKS
```

```
S.cerrevisiae      54  DVNDRLELVKLLIDTYKEAE-S-----
Mucor             52  KTEHELGLKLLTEIYTDAP-E-----
Apis              47  YPADIRKGMILLDLYCNHSDS-----
Homo              47  YNDDIRKGI VLLEELPKGSKE-----
Phaeodactylum  57  QASELRVAVSTLGLVKDGYEH-----
Plasmodium       44  DLKNIQLASSLHEL LLYNR-----
Physcomitrella   55  NQSDVQGTAMLEAAAGVGAP-----
T.brucei         65  RNSYVESGWRLESTAFALWQRWGGPTHAQLQOACKIEEPLXADGSGAPASPNLQQLVS
Dictyostelium    169  NVPYVKGELAMEKKTFDNRIYLELSN---
Bodo              68  NPLHKKEGITLSESLYFQYAE-----ERRRANAAAKQATVAGGLAATAPP-----
Leishmania       181  NTMAQRARDSGTQATLIRGSAVQFATAPPPPECEGVPVPSLVRDRGSPAALTE-----
Naegleria        162  NEALHKKGLKLLSILRDHSDFN-----
```

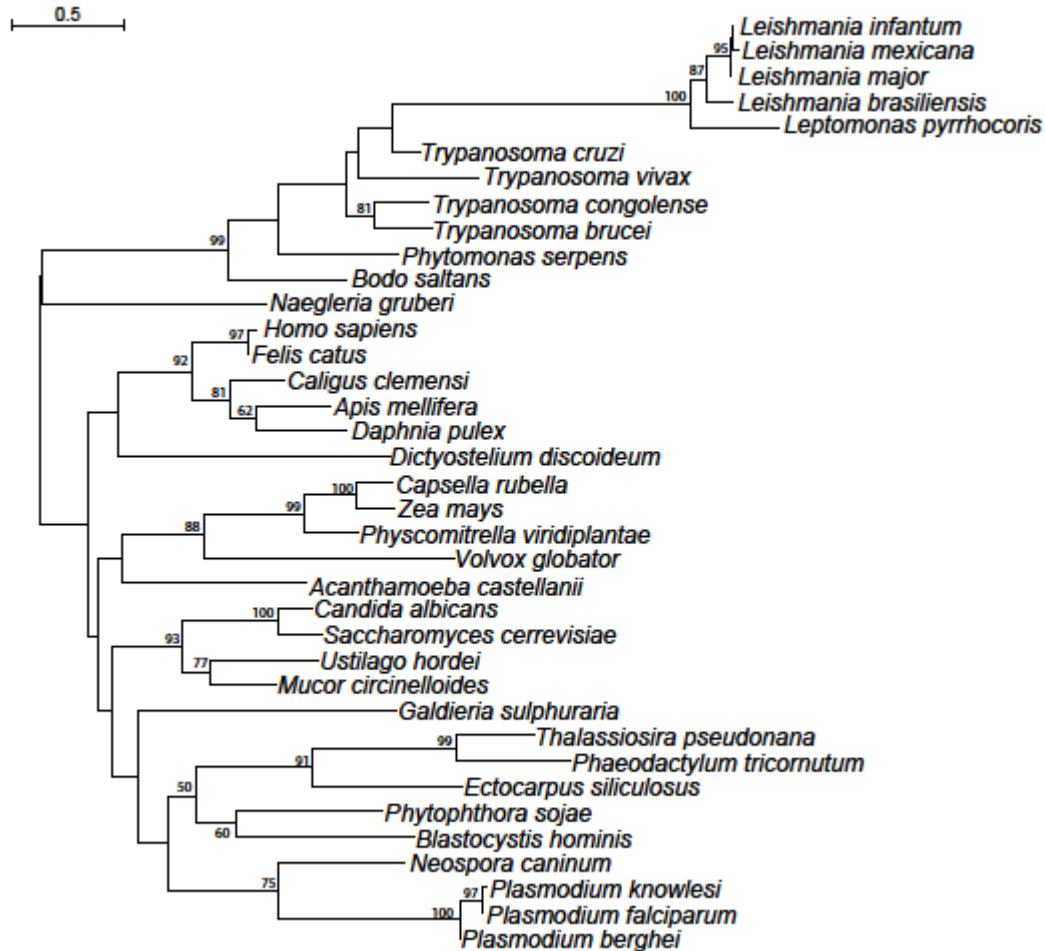




Obr.11: Alignment proteinu Fis1 u vybraných eukaryotických organismů.  
TM = transmembránová doména, TPR= tetratrikopeptidové repetice

#### 4.1.2. Fylogenetický strom Fis1

Stávající dataset, který byl použit pro alignment byl rozšířen od další eukaryotní organismy, u kterých se nacházel gen pro Fis1 (homologie musela mít hodnotu nejméně  $E=2e-10$ ). Pomocí RAxML (Stamatakis, 2006) byl metodou maximální věrohodnosti (Maximum likelihood) zhotoven fylogenetický strom (obr.12). Na stromku je vidět, že Fis1 se vyskytuje napříč eukarotním stromem. V rámci Kinetoplastid se vyskytuje i v rodu *Leishmania*, ačkoliv je značně odlišný.



Obr.12: Fylogenetický strom Fis1 proteinu u vybraných eukaryotických organismů.

Fylogenetická analýza byla provedena metodou Maximum likelihood v programu RAxML 7.4.8b (Stamatakis 2006) s využitím gama-korigované LG substituční matice. Podpora větvení byla vypočítána pomocí metody non-parametric bootstrap z 500 replikací.

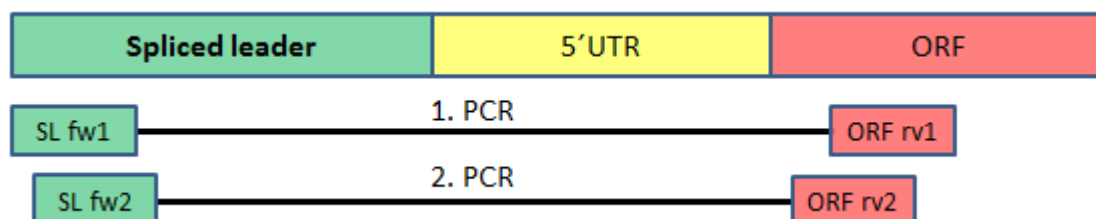
## 4.2. Mapování UTR oblastí

Jelikož jsme nevěděli, jak velké jsou 5' UTR a 3' UTR oblasti u genu *TbFis1*, rozhodli jsme se je osekvenovat. RNAi fragment měl být navržen v jedné z těchto oblastí, vzhledem k plánovaným rescue experimentům.

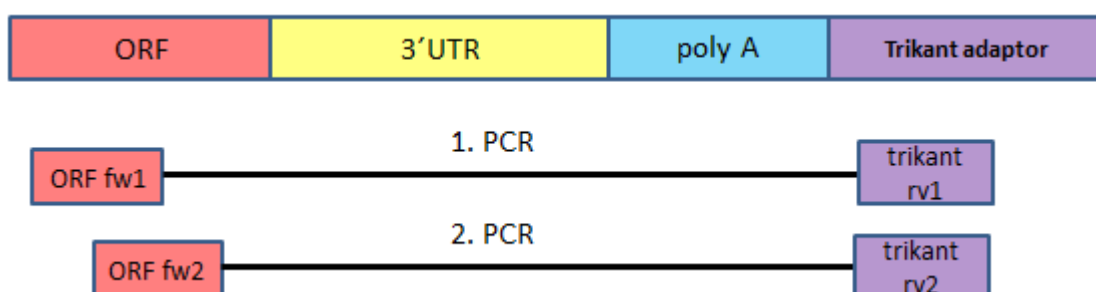
Po první PCR jsme zkontrolovali, jestli byl namnožen produkt očekávané velikosti. Poté následovala druhá PCR s primery mírně posunutými dovnitř a výsledný PCR produkt o velikosti 403 bp u 5'UTR a 407 bp u 3'UTR jsme vyřízli z gelu, zaklonovali do TOPO vektoru a osekvenovali. Z mapování vyšlo, že 5'UTR má 296 bp a je větší než 3' UTR s 123

bp (obr.13). Na základě výsledků ze sekvenace jsme navrhli primery pro *TbFis1* RNAi, kde výsledný RNAi fragment pokrývá 5'UTR.

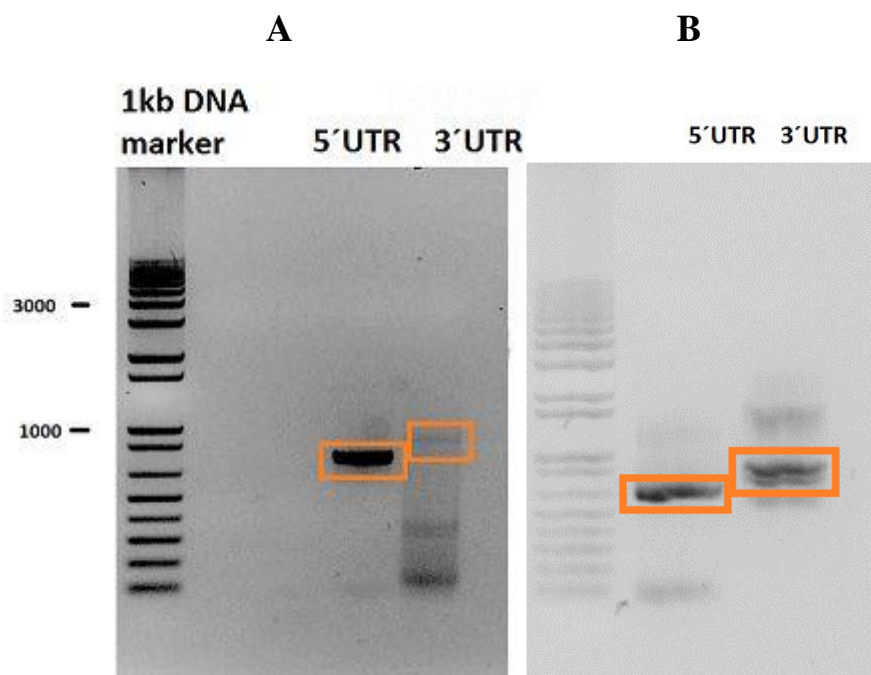
**A**



**B**



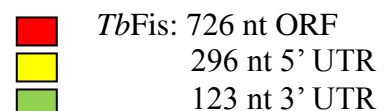
Obr.13: Schéma mapování 5'UTR (A.) a 3'UTR (B.)



Obr.14: 1.PCR (A.) a 2, PCR (B.) ke zmapování 5'UTR a 3'UTR oblastí.

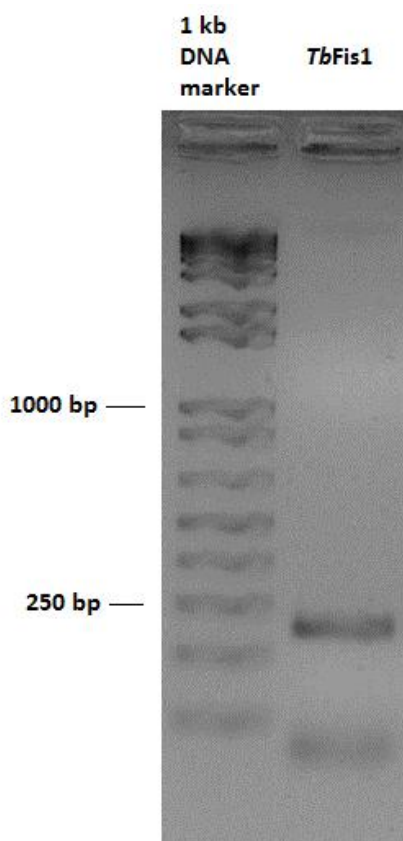


Obr.15: Mapa 5' a 3' UTR oblasti.

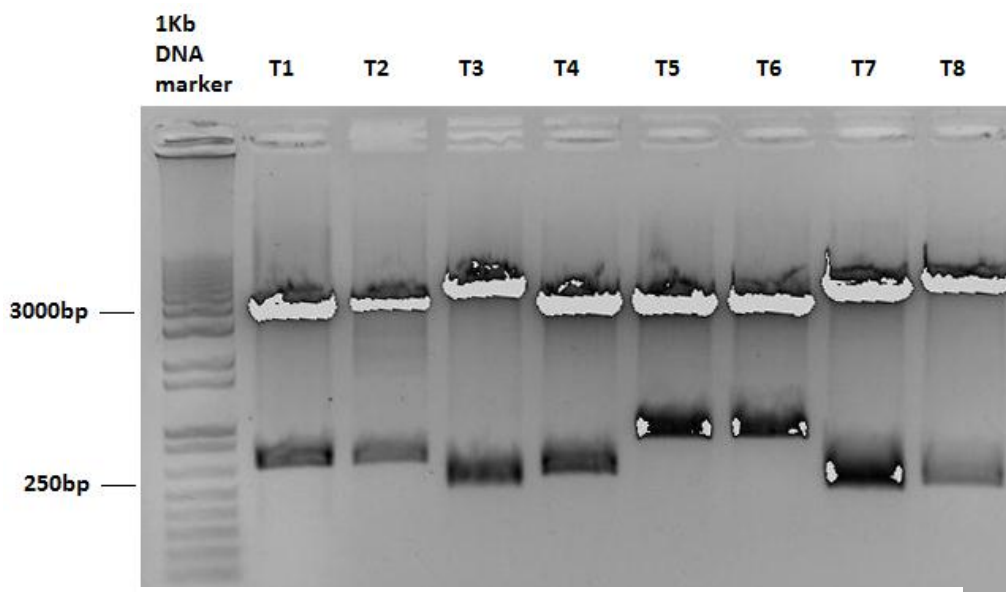


### 4.3. *TbFis1* RNAi konstrukt

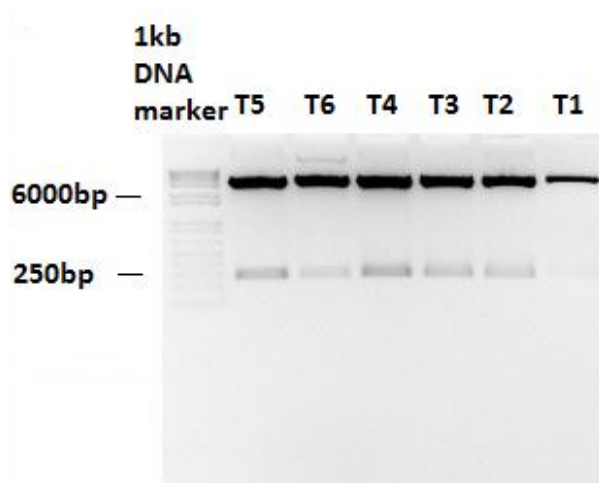
Po amplifikaci byla velikost PCR produktu zkontrolována elektroforeticky (obr. 16), a následně byl produkt zaklonován do TOPO vektoru a zkontrolována jeho správné zaintegrování pomocí restrikčního enzymu *EcoRI* (obr.17). RNAi fragment byl překlónován do P2T7 – 177 plazmidu (obr.18) a výsledek opět překontrolován pomocí restrikční analýzy enzymy *BamHI* a *HindIII*. Poté následovala linearizace vektoru enzymem *NotI*, a jeho tansfekce pomocí elektroporace do WT linie *T. brucei*.



Obr.16: Kontrola produktu po PCR amplifikaci.  
Viditelný proužek označuje *TbFis1* RNAi fragment, u něhož byla očekávaná velikost 241bp.



Obr.17: Kontrola TOPO vektoru s RNAi fragmentem.  
Vrchní proužky označují TOPO vektor s velikostí 3000bp. Spodní proužky označují RNAi fragment. Pro další experiment jsme vybrali T7 a T8 TOPO vektor s RNAi fragmentem.



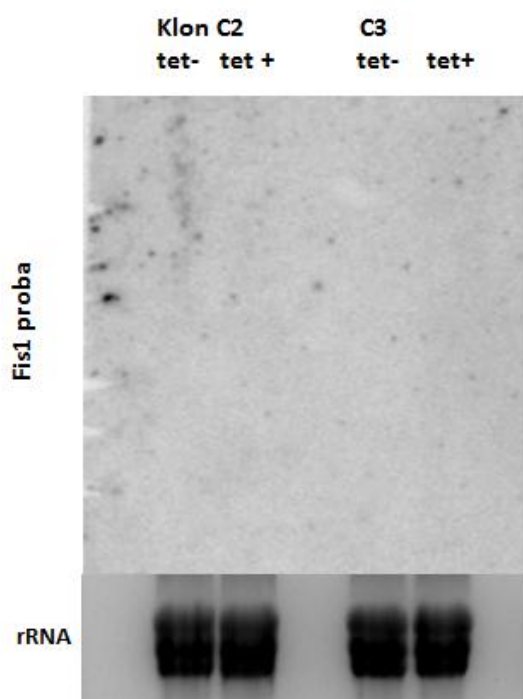
Obr.18: Kontrola plazmidu p2T7 – 177 s RNAi fragmentem.  
Vrchní proužky označují plazmid p2T7 – 177 s velikostí 6000bp. Spodní proužky označují RNAi fragment s velikostí 241bp. Pro další experiment jsme vybrali klony T2, T3, T5.

#### 4.4. Ověření *TbFis* RNAi KD

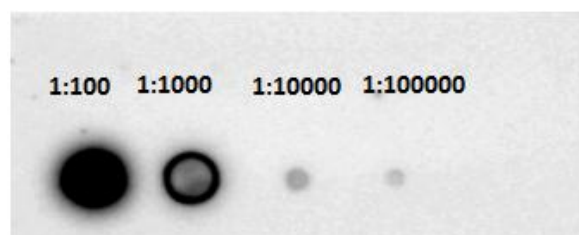
Pro ověření funkčnosti RNA interference u námi vytvořené *TbFis* linie, tzv. knock-downu (KD) jsme využili metodu Northernové analýzy a kvantitativní PCR (qPCR), které umožňují detekovat úbytek specifické mRNA.

#### 4.4.1. Northern analýza

Northern blot byl použit na klonech, které byly vyselektovány na phleomycinu (C2, C3). PCR produkt, vzniklý s použitím stejných primerů jako v případě RNAi fragmentu, byl radioaktivně označen a vzniklá proba by měla detekovat *TbFis* transkript (mRNA) společně s dsRNA, která je vytvářena pouze v indukovaných buňkách. Jak je vidět na obrázku 19, na membráně jsme nedetekovali žádný signál (horní panel), ačkoliv RNA byla rovnoměrně nanesena na gel a nebyla degradovaná (spodní panel).



Obr.19: Northern analýza  
C2, C3 označuje klona *TbFis1* RNAi, na o  
Spodní obrázek ukazuje kontrolu EtBr gelu,  
kde jsou 3 očekávané velikosti rRNA.



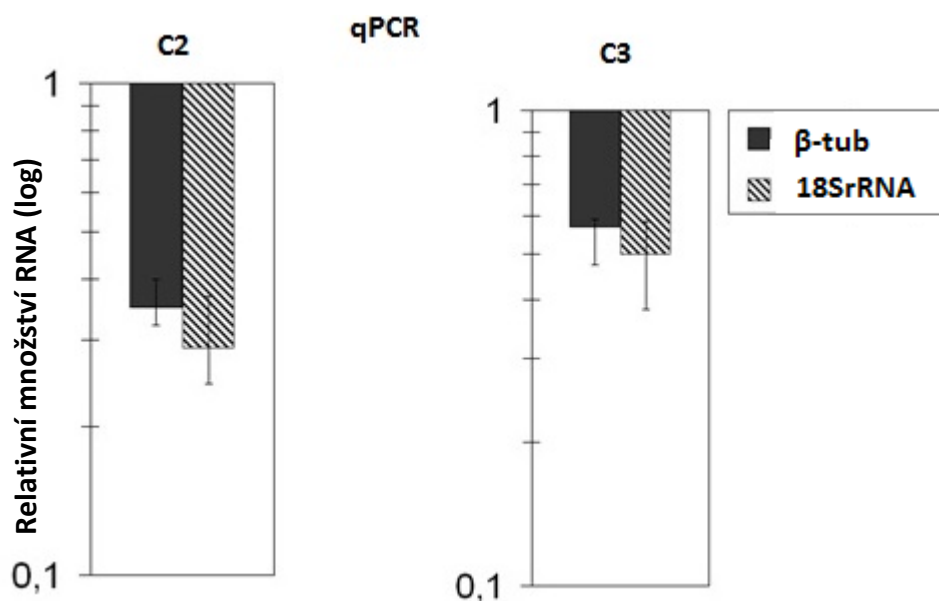
Obr.20: Kontrola proby

K ověření síly a specifity proby nám posloužil tzv. dot blot (obr.20). Jedná se o membránu, na kterou je nakapán PCR produkt sekvencí identický probě. PCR produkt byl naředěn 100x a dále pak desítkovou řadou až do nejnižší koncentrace 1: 100 000. Jak je vidět z testu, radioaktivní signál je viditelný i při nejvyšším ředění a proba je tedy plně funkční. Nicméně *TbFis* transkriptu je v buňce pravděpodobně tak málo, že je použitou metodou nedetekovatelný a Northern analýza byla neprůkazná.

#### 4.4.2 qPCR

Vzhledem k nedostatečné citlivosti předchozí metody byly stejné RNAi klony (C2, C3) testovány pomocí qPCR. Tato metoda umožňuje relativní porovnání počtu kopií mRNA

u neindukovaných a indukovaných buněk. Housekeeping geny jako je beta tubulin ( $\beta$ -tub) či malá podjednotka jaderné ribosomální RNA (18S rRNA) jsme použili jako normalizační geny, které by měli zůstat nezměněny během RNAi a slouží jako kontrola kvality a množství RNA ve vzorku. Z grafu na obrázku 21 je vidět, že umlčení *TbFis* genu je účinnější u klonu C2, kde pokles mRNA dosahuje až 80%. Proto jsme klon C2 vybrali jako stěžejní pro následnou fenotypickou analýzu.

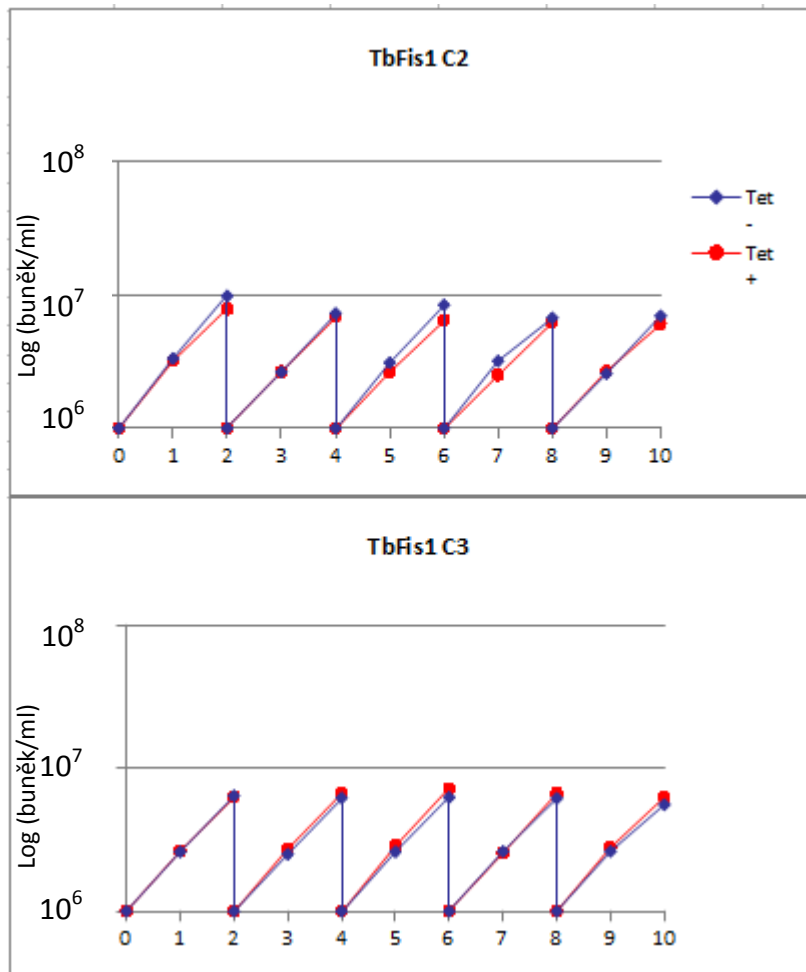


Obr.21: qPCR analýza *TbFis* mRNA u RNAi KD. C2 a C3 je označení pro klony *TbFis1* RNAi.

#### 4.5. Růstová křivka

U klonů C2 a C3 jsme počítali množství neindukovaných (Tet-) a indukovaných (Tet+) buněk po dobu deseti dnů od přidání tetracyklinu. Počáteční koncentrace buněk byla  $2 \times 10^6$ /ml, následující den byly buňky vždy změřeny a naředěny na počáteční koncentraci. Po celou dobu experimentu buňky nevykazovaly žádnou změnu v růstu ani žádné morfologické rozdíly viditelné mikroskopicky. Výsledná logaritmičká křivka tedy ukázala, že *TbFis* není u trypanosomy esenciální protein (obr.22).





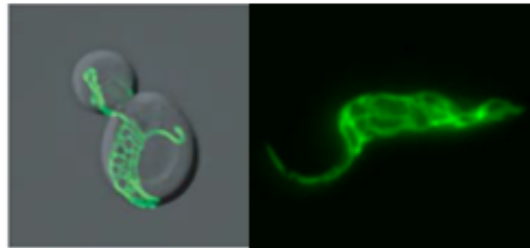
Obr.22: Růstová křivka C2 a C3 klonů *TbFis1*.  
Tet+ označuje indukované buňky tetracyklinem, tet- je kontrola.

## 5. Diskuze a závěr

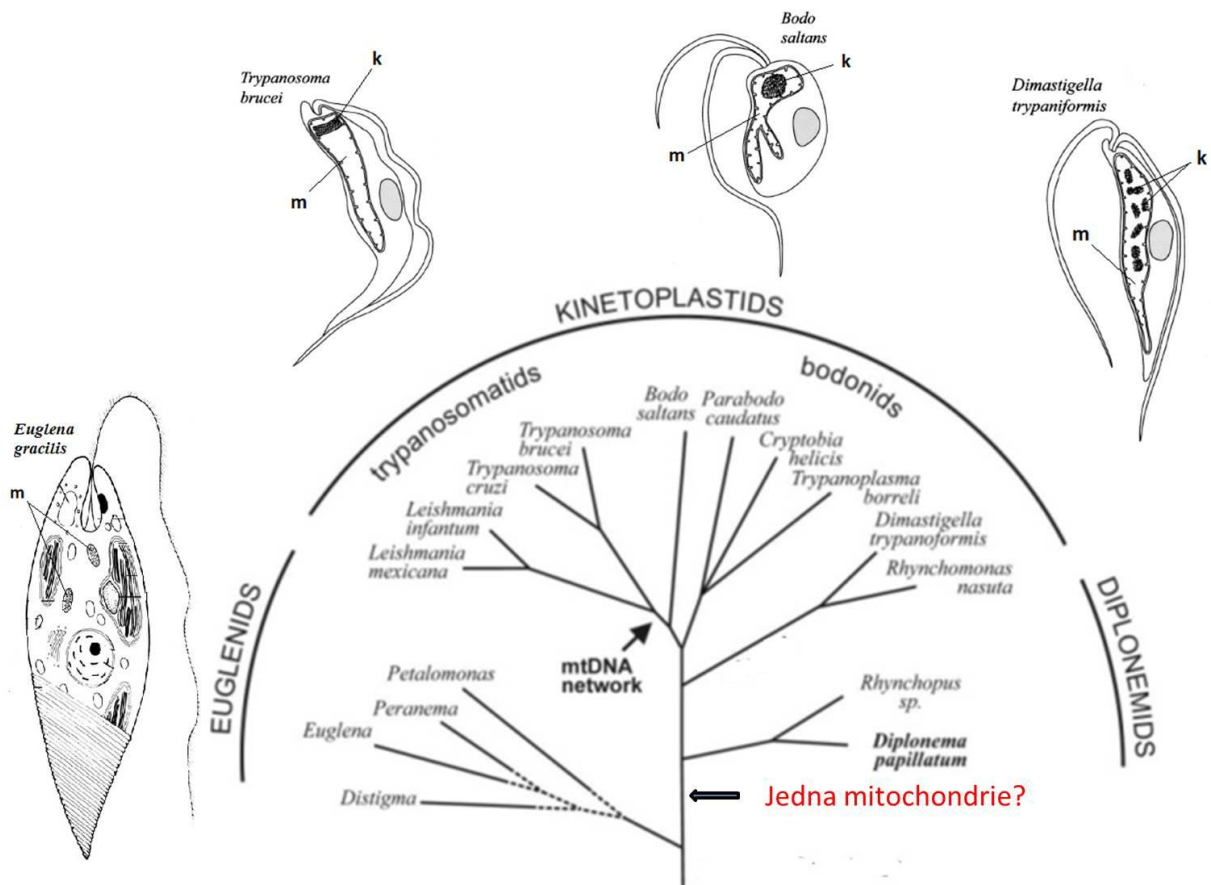
V této práci jsem se zaměřil na studium Fission proteinu (*TbFis*), potenciálního kandidáta mitochondriálního dělení u *Trypanosomy brucei*. Homolog tohoto genu se nachází u většiny eukaryotních organismů, ale byl studován hlavně u kvasinek a savců. V kvasinkách tento protein napomáhá v zacílení dynaminu (*Dnm1p*), coby klíčového hráče mitochondriálního dělení, na vnější mitochondriální membránu (*Okamoto et. al.* 2005). U savců se názory na jeho funkci rozcházejí. Měl mít podobnou funkci jako u kvasinek (*Stojanovski et al.* 2004), ale na základě nových poznatků, konkrétně článku od *Otera et. al.* (2010), bylo zjištěno, že tuto funkci plní jiný protein označený *Mff* a *Fis1* nehraje klíčovou roli, nicméně je pořád nezbytný pro mitochondriální dělení spolu s nově objevenými proteiny *Mid49/51* (*Losón et al.*, 2013).

Protože byla funkce *Fis* proteinu v literatuře nejednoznačná, rozhodli jsme se ověřit jeho možnou účast v mitochondriálním dělení u *T. brucei*, která představuje jednoho z nejstarších eukaryotních organismů. K vypnutí *TbFis* genu jsme využili RNA interferenci, která selektivně degraduje cílovou mRNA. Vzhledem k tomu, že jsme do budoucna plánovali tzv. „rescue“ experimenty, bylo třeba navrhnout RNAi primery mimo otevřený čtecí rámec genu. K tomu nám posloužily tzv. UTR oblasti, které představují nepřekládanou oblast RNA. Mapování ukázalo, že 5' UTR oblast je větší než 3'UTR, a proto RNAi fragment pokrýval dříve zmiňovanou oblast. Po úspěšném zaklonování RNAi vektoru do genomu *T.brucei* a vytvoření stabilních linií bylo třeba zjistit, zda dochází k degradaci cílové mRNA. K tomu jsme nejprve použili Northernovou analýzu, ale tato metoda nepřinesla žádnou odpověď. Na membráně nebyl detekován žádný radioaktivní signál, ačkoliv proba byla dostatečně silná a specifická, což jsme zjistili pomocí dot blotu. *TbFis* pravděpodobně představuje málo abundantní transkript, který je v buňce tak vzácný, že ho nejsme schopni zachytit. Proto jsme použili citlivější metodu na ověření funkčnosti RNA interference a to kvantitativní PCR (qPCR). Zjistili jsme, že množství *TbFis* mRNA bylo u indukovaných buněk sníženo zhruba o 80%, což představovalo dostatečný pokles pro následné pokusy. Z růstové křivky bylo patrné, že u buněk nedochází ke zpomalení růstu a ani nebyly pozorovány žádné další morfologické změny. Zdá se tedy, že *TbFis1* není pro trypanosomu esenciální a nepodílí se na dělení mitochondrie. Protein má pravděpodobně jinou funkci nebo hraje jen malou roli při zacílení *TbDLP* na vnější membránu podobně jako je tomu v savčím modelu.

Celkově se zdá, že mechanismus mitochondriálního dělení je u trypanosomy redukován. Nepodařilo se nám nalézt homology Mff, Caf4/Mdv či Mid 49/51 proteinů, které jsou přítomny u jiných eukaryot. Jediným proteinem, u kterého byla prokázána funkce v mitochondriálním dělení u *T.brucei* zatím zůstává pouze dynamin (*TbDLP*) (Losón *et al.*, 2013).



obr:23: Srovnání  $\Delta$ Dnm1 mutantu u *Saccharomyces* a mitochondrie *T.brucei* (Okamoto *et al.*, 2005)



Obr.24: Vývoj mitochondrie s obrázky jednotlivých zástupců. (fylogenetický strom převzatý z Marande *et al.*, 2005)

m= mitochondrie, k= kinetoplast

Obrázky *T.brucei*, *D. trypaniformis* a *B.saltans* jsou převzaty z Lukeš *et al.*, 2002, *E. gracilis* (M. Krausová: <http://www.sinicearasy.cz/134/Euglenophyta>)

Zajímavostí je, že při pozorování mitochondrie  $\Delta$  Dnm1 mutanta u kvasinky (obr. 23) jsme si všimly nápadné podobnosti s mitochondrií *T.brucei*. Vypadá to tedy, že *T.brucei* by mohla být jakýmsi přirozeně vzniklým „fission“ mutantem. Otázkou nicméně zůstává, kdy v minulosti ke ztrátě fission proteinů a k následné fúzi mitochondrií došlo. Když se podíváme na morfologii a četnost mitochondrií u dalších jednobuněčných zástupců blízkých trypanosomě (obr. 24), zdá se, že k vytvoření jedné síťovité mitochondrie mohlo dojít někde mezi euglenami a diplomou. Tuto zajímavou hypotézu by bylo nutné experimentálně potvrdit, což ovšem sahá nad rámec této bakalářské práce, nicméně to otvírá řadu zajímavých otázek do budoucna.

## 6. Seznam zkratek

BF – krevní stadium *T.brucei*

Caf4 - CCR4 associated factor

cDNA – copy DNA

Dnm1/Drp1/Dlp - dynamin-related GTPase

dsDNA – dvouřetězcová DNA

dsRNA – dvouřetězcová RNA

E.coli - Escherichia coli

Fis1/hFis – fission 1/human fission

Fw primer – forward primer

G – G418 antibiotikum

H – hygromycin

IPTG - isopropylthio- $\beta$ -galaktosid

ORF – otevřený čtecí rámeček

mRNA – messenger RNA

Mdm36 - mitochondria-associated protein

Mdv1 – mitochondrial division 1

Mff – mitochondrial fission factor

num1 - nuclear migration 1

P – phleomycin

qPCR – real – time PCR

PCR – polymerázová řetězová reakce

PF – procyklický stadium *T.brucei*

RNAi – RNA interference

Rv primer – reverse primer

SL – splice leader sekvence

TPR - tetratricopeptidové repetice

UTR – nepřekládaná oblast

UV – ultrafialové záření

X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid

## 7. Seznam literatury

Bleazard W., McCaffery J. M., King E. J., Bale S., Mozdy A., *et al.* (1999) The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* **1**: 298–304.

Bochud-Allemann N., Schneider A. (2002) Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **277**: 32849–32854.

Boldogh I.R., Pon L.A. (2006) Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 450-462.

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

Cechci G., Paone M., Franco J.R., *et al.* (2009) Towards the Atlas of human African trypanosomiasis, *International Journal of Health Geographic*, 8 (15).

Cervený K.L., Studer S.L., Jensen R. E., and Sesaki H. (2007) Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell* **12**: 363-375.

Chanez A., Hehl B. A., Engstler M Schneider A. (2006) Ablation of the single dynamin of *T. brucei* blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. *Journal of Cell Science* **119**: 2968-2974.

Djikeng A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001) RNA interference in *Trypanosoma brucei*: Cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* **7**: 1522-1530.

Drozd M., Quijada L., Clayton C. E. (2002) RNA interference in trypanosomes transfected with sense and antisense plasmids. *Mol Biochem Parasitol* **121** (1): 149-52.

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

Farkasovsky M. and Kuntzel H. (2001) Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol* **152**: 251-262.

Fedič R., Žurovec M., Sehnal F. (2003), Correlation between fibroin amino acid sequence and physical silk properties, *J Biol Chem* **278** (37): 35255 – 35264.

Field M. C. and Carrington M. (2004) Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic* **5**: 905-913.

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

Gandre-Babbe S., van der Blik A.M. (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **19**: 2402-2412.

Griffin E.E., Graumann J. and Chan D. C. (2005) The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* **170**: 237-248.

James D. I., Parone P.A., Mattenberger Y., and Martinou J. C. (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**:36373-9.

Kageyama Y., Zhang Z., Sesaki H., (2011) Mitochondrial division: molecular machinery and physiological functions. *Curren opinion in cell biology* **23**: 427–434.

Krausová M.,: <http://www.sinicearasy.cz/134/Euglenophyta>. 20. 9. 2013

Ketting RF., (2011): The many faces of RNAi. *Dev cell* **20**: 148-161.

Losón O., Song Z., Chen H, Chan, D., (2013) Fis1, Mff, MiD49 and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* **12**: 10-0721.



Lukeš J., Guilbgride D. L., Votýpka J., Zíková A., Benne R., Eglund P. T. (2002) Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell* **1**: 495-502.

Lukeš J., Hashimi H., Verner Z., Čičová Z. (2010) The remarkable mitochondrion of trypanosomes and related flagellates. In: W. de Souza (Ed.), Structures and Organelles in Pathogenic Protists. *Microbiology Monographs 17. Springer-Verlag, Berlin*,: 228–252.

Lye FL., Owens K., Shi H., Murta S., Vieira S., Tschudi C., Ullu E., Beverly S. (2010) Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *Plos pathog* **6** (10).

Marande W., Lukeš J., Burger G., (2005) Unique mitochondrial genome structure in diplomids, the sister group of kinetoplastids. *Eukaryotic Cell* **4**: 1137-1146.

Matthews, K. R., (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Science* **35 118**: 283-290.

McKean P. G. (2003) Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 600-7.

Mohr S., Perrimon N., (2012): RNAi screening: new approaches, understanding, and organism. *WIREs RNA* **2**: 145-58.

Morgan G. W., Goulding D. and Field M. C. (2004). The single dynamin like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem* **279**: 10692-10701.

Mozdy A.D., McCaffery J.M., and Shaw J. M. (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* **151**: 367-380.

Naylor,K., Ingerman,E., Okreglak,V., Marino,M., Hinshaw,J.E., and Nunnari,J. (2006). Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J. Biol. Chem* **281**, 2177-2183.

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

Okamoto, K., and J. M. Shaw (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* **39**: 503-36.

Otera H., Wang C., Cleland M.M., Setoguchi K., Yokota S., Youle R.J., Mihara K. (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* **191**: 1141-1158.

Otsuga D., Keegan B. R., Brisch E., Thatcher J. W., Hermann G. J., Bleazard W. And Shaw J.M. (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* **143**: 333-349.

Palmer C.S., Osellame L.D., Laine D., Koutsopoulos O.S., Frazier A.E., and Ryan M.T. (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* **12**: 565-573.

Parsons M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol. Microbiol.* **53**: 717-724.

Pfaffl MW. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.

Pitts K. R., Yoon Y., Krueger E. W., and McNiven M. A. (1999) The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **10**: 4403–4417.

Roux A., Uyhazi K., Frost A. and De C.P. (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441**: 528-531.

Shaked H., Wachtel C., Tulinski P., Yahia N., Barda O., Darzynkiewicz E., Nilsen T., Michaeli S. (2010) Establishment of an in vitro trans-splicing system in *Trypanosoma brucei* that requires endogenous spliced leader RNA. *Nucleic Acids Research* **38** (10).

Schauss A.C., Bewersdorf J., and Jakobs S. (2006) Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J Cell Sci* **119**: 3098-3106.

Schauss A.C., McBride H.M. (2007) Mitochondrial fission: a non-nuclear role for Num1p. *Curr Biol* **17**: 467-470.

Schneider, A. (2001) Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int J Parasitol* **31**: 1403-15.

Simaro P.P., Cechci G., Paone M, *et al.* (2010) The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases, *International Journal of Health Geographic* **9**: (53).

Steverding, D. (2008) The history of African trypanosomiasis, *Parasites Vectors* **1**: (3).

Stojanovski D., Koutsopoulos O.S., Okamoto K., Ryan M. T. (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci* **117**: 1201–10.

Suzuki M., Neutzner A., Tjandra N., and Youle R.J. (2005) Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* **280**: 21444-21452.

Tieu Q, Nunnari J. (2000) Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* **151**: 353–66.

Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* **158**: 445-452.

Tyler K. M., Matthews K.R., Gull K. (2001) Anisomorphic cell division by African trypanosomes. *Protist* **152**: 367–378.

Ullu E., Tschudi C., Chakraborty T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* **6** (6): 509-19.

Vafai S., Mootha V. (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **419**: 374-383.

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

Wirtz E., Leal S., Ochatt C., Cross G.A. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **99**: 89-10.

Zhang Y., Chan D.C. (2007) Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18526-1853.