

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Exprese a purifikace mitochondriálních
membránových proteinů jednobuněčného parazita
Trypanosoma brucei za účelem tvorby protilátek**

Bakalářská práce

Simona Urbanová

Školitel: RNDr. Alena Panicucci Zíková, PhD.

Školitel-specialista: Mgr. Eva Doleželová, PhD.

České Budějovice 2018

Urbanová, S., 2018: Expres a purifikace mitochondriálních membránových proteinů jednobuněčného parazita *Trypanosoma brucei* za účelem tvorby protilátek. [Expression and purification of mitochondrial membrane proteins from an unicellular parasite *Trypanosoma brucei* for the production of antibodies. Bc. Thesis in Slovak] - 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotácia:

Expression plasmids of the *TbRISP*, *TbCOXIV* and *TbNDUFA6* genes were generated by molecular cloning. Recombinant proteins *TbRISP*, *TbCOXIV* and *TbNDUFA6* were expressed in *E. coli*, affinity purified, and used to raise antisera in rabbits. The specificity of generated polyclonal antibodies was tested by Western blot analysis.

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu som vypracovala samostatne iba s použitím prameňov a literatúry uvedených v zozname citovanej literatúry.

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení súhlasím so zverejnením mojej bakalárskej práce, a to elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databáze STAG poskytovanou Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na ich internetových stránkach, a to so zachovaním môjho autorského práva k odovzdanému textu tejto kvalifikačnej práce. Súhlasím ďalej s tým, aby tou istou elektronickou cestou boli v súlade s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zverejnené posudky školiteľa a oponentov práce i záznam o priebehu a výsledku obhajoby kvalifikačnej práce. Taktiež súhlasím s porovnaním textu mojej kvalifikačnej práce s databázou kvalifikačných prác Theses.cz poskytovanou Národným registrom vysokoškolských kvalifikačných prác a systémom na odhaľovanie plagiátov.

České Budějovice, 17. apríla 2018

.....

Simona Urbanová

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela veľmi pod'akovať mojej školiteľke Alene Zíkovej, ktorá ma prijala do svojho tímu a umožnila mi vykonávať bakalársku prácu v krásnych priestoroch laboratória s využitím moderných technológií. Taktiež by som sa rada pod'akovala všetkým členom laboratória, ktorí mi vedeli v prípade nejasností vždy pomôcť. Konkrétne Evke Doleželovej, za jej cenné poznatky a rady, ktoré mi s trpezlivosťou odovzdala a za naučenie množstva základných metód molekulárnej biológie. Ďalej Miške, za jej veľkú ochotu mi poradiť a vysvetliť čokoľvek o čo som ju poprosila. Za morálnu, ale aj finančnú podporu patrí obrovské ďakujem celej mojej rodine, pretože bez nich by som nebola tam, kde som. Predovšetkým rodičom, ktorí ma vždy pred skúškou ubezpečovali, že nie je dôvod, aby som ju nespravila, veď som šikovná a učila som sa. Babke, ktorá každú skúšku prežívala so mnou a modlila sa za mňa. Bezpochyby veľké ďakujem patrí môjmu priateľovi za jeho tolerovanie môjho štúdia tak ďaleko, a taktiež podporu vo všetkých smeroch. V neposlednom rade ďakujem mojej spolubývajúcej, s ktorou sme sa navzájom povzbudzovali a chvíľky s ňou prebiehali na koleji oveľa veselšie.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Trypanozómy	1
1.2 Životný cyklus <i>T. brucei</i>	1
1.3 Mitochondrie	3
1.4 Glykolýza	4
1.5 Katabolizmus aminokyselín	5
1.6 Krebsov cyklus	5
1.7 Oxidatívna fosforylácia	6
1.7.1 Respiračný reťazec krvných foriem <i>T. brucei</i>	6
1.7.2 Respiračný reťazec procyklických foriem <i>T. brucei</i>	7
1.8 Produkcia protilátok proti respiračným komplexom I, III a IV	8
2 Ciele práce	9
3 Materiály a metódy	10
3.1 Primery pre amplifikáciu génov <i>TbRISP</i> , <i>TbCOXIV</i> a <i>TbNDUFA6</i>	10
3.2 PCR	10
3.2.1 PCR reakcie pre <i>TbRISP</i> a <i>TbCOXIV</i>	11
3.3 DNA elektroforéza	12
3.4 Izolácia DNA z gélu	12
3.5 Ligácia	12
3.5.1 Ligácia inzertu do vektoru pGEM [®] - T easy	12
3.5.2 Ligácia inzertu do vektoru pSKB3	13
3.6 Transformácia plazmidového vektoru do <i>E. coli</i> XL1 Blue	14
3.7 Izolácia plazmidovej DNA	15
3.8 Restriкция plazmidovej DNA k overeniu prítomnosti inzertu v plazmide	16
3.9 Sekvenácia	17
3.10 Príprava expresných buniek C41	17
3.11 Transformácia do expresných buniek C41	17
3.12 Expresia rekombinantných proteínov	18
3.12.1 Príprava lyzátu	18
3.12.2 Testovanie rozpustnosti proteínu	18
3.13 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	19
3.14 Purifikácia rekombinantných proteínov	19

3.14.1 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia HPLC	20
3.15 Dialýza	21
3.16 Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovej metódy	21
3.17 Produkcia protilátok	22
3.18 Western blot	22
4 Výsledky	24
4.1 Amplifikácia úsekov DNA <i>TbRISP</i> , <i>TbCOXIV</i> a <i>TbNDUFA6</i> génov	24
4.2 Klonovanie do vektorov a overenie správnosti pomocou restriktívnej analýzy	25
4.3 Expresia a testovanie rozpustnosti rekombinantných proteínov	26
4.4 Purifikácia rekombinantných proteínov <i>TbRISP</i> , <i>TbCOXIV</i> a <i>TbNDUFA6</i>	30
4.5 Určenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou	34
4.6 Western blotting	34
5 Diskusia a záver	37
6 Zoznam použitej literatúry	39
7 Prílohy	43

1 Úvod

1.1 Trypanozómy

Trypanozómy vo všeobecnosti patria do triedy Kinetoplastida, čo sú bičíkatí prvoci z kmeňa Euglenozoa (Stuart et al., 2008).

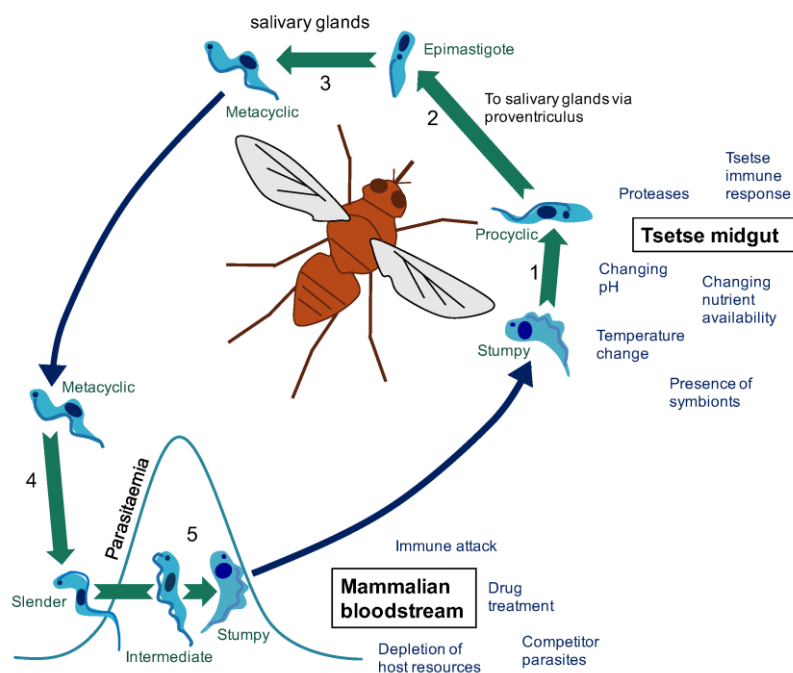
Trypanosoma brucei spôsobuje ľudskú africkú trypanozomiázu (HAT), tzv. spavú nemoc a chorobu nagana (Lejon et al., 2003). Zahŕňa tri podskupiny, a to: *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, ktoré infikujú širokú škálu cicavcov (Stuart et al., 2008). *Trypanosoma brucei brucei* spôsobuje ochorenie nagana, čo je infekčné ochorenie nielen hospodárskych, ale aj divokých zvierat, ktorá sa vyskytuje v rovníkovej oblasti Afriky, čím spôsobuje nemalé ťažkosti v rámci sociálno-ekonomického rozvoja v tejto krajine (Isaac et al., 2017). Vektorom týchto trypanozóm je rada druhov rodu *Glossina* (Bateta et al., 2017). Tento parazit však nevie infikovať človeka, pretože je náchylný na cytotoxickú aktivitu ľudského séra spôsobenú prítomnosťou trypanozómového lytického faktoru 1 (ApoL1), ktorý je zložkou lipoproteínov TLF1 a TLF2 o vysokej hustote (Oli et al., 2006; Molina Portela et al., 2003). *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodesiense* napádajú nielen živočíchov, ale aj ľudí za vzniku spavej choroby. Významným prenášacím vektorom je najmä *G. morsitans*, *G. palpalis* a *G. pallidipes* v subsaharskej Afrike (Stuart et al., 2008).

1.2 Životný cyklus *T. brucei*

Trypanozómy počas života prekonávajú rýchle a podstatné zmeny v morfológii buniek, expresii hlavných povrchových markerov i v signalizačných dráhach (Fenn & Matthews, 2007). Tieto procesy sú vyvolané vonkajšími stimulmi, akými je zmena pH, teplota, alebo *in vitro* prídanie medziproduktov Krebsovho cyklu, napríklad cis-akonitátu alebo citrátu (Czichos et al., 1986). Majú zložitý životný cyklus zahŕňajúci dve hlavné, odlišné štádiá v krvnom obehú cicavcov a niekoľko etáp v príslušnom hmyzom vektore (Herman et al., 2008) (obr. 1).

Počas cicania krvi na infikovanom hostiteľovi sa do muchy tse-tse dostanú neproliferujúce sa trypanozómy. V jej gastrointestinálnom trakte dochádza k premene krvných trypomastigótov na procyklických trypomastigótov, ktorí putujú do slinných žliaz, kde dosiahnu štádium epimastigóta (Kennedy, 2013). Toto štádium je schopné sa ďalej deliť

za vzniku metacyklických trypomastigótov, ktoré mucha tse-tse injektuje do pokožky hostiteľa, kde prechádzajú lymfatickým systémom až do krvného obehu cicavcov (Kennedy, 2013; Matthews et al., 2004). V krvnom riečisku cicavcov vykazujú dve vývojové formy: „slender“ formu a „stumpy“ formu. V „slender“ forme dochádza k ich proliferácii so schopnosťou vyhnúť sa imunitnému systému prostredníctvom antigénnej variácie. „Stumpy“ forma je naopak neschopná proliferácie, prispôbená na ďalší prenos počas uštipnutia do muchy tse-tse (Silvester et al., 2017). Táto forma vykazuje relatívnu rezistentnosť voči lýze proteolytickým prostredím stredného čreva u muchy tse-tse a dochádza u nich k zastaveniu bunkového cyklu v G1 fázi, čo im umožňuje schopnosť nedeliť sa. Absencia delenia u „stumpy“ formy obmedzuje hustotu parazitov v krvi, čím zaisťujú pre hostiteľa dlhší život a pre seba väčšiu pravdepodobnosť prenosu ochorenia (Matthews, 2005).



Obr. 1: Životný cyklus *T. brucei* (Silvester et al., 2017). (1) Infikovanie muchy tse-tse krvou hostiteľa s následnou premenou neproliferujúcich buniek („stumpy“ foriem) na procyklické. (2) Vývoj *T. brucei* v črevách s postupným presunom do slinných žliaz za vzniku epimastigotných buniek. (3) Následná produkcia metacyklických buniek spojená s infekciou cicavčieho hostiteľa. (4) Tvorba „slender“ a „stumpy“ foriem (Silvester et al., 2017).

1.3 Mitochondrie

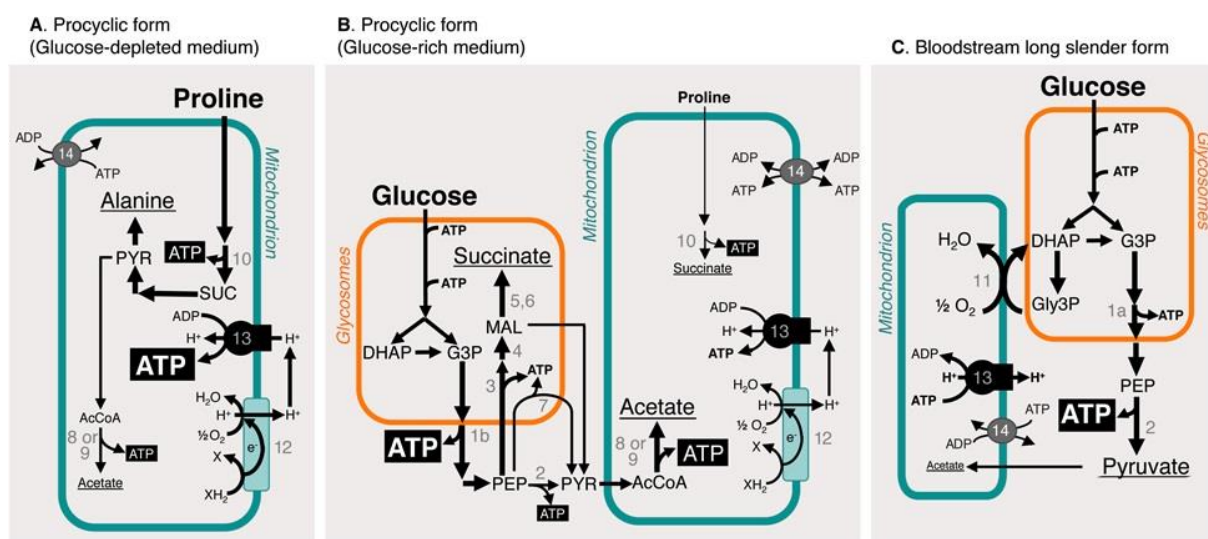
Mitochondrie sú semiautonómne organely väčšiny eukaryotických buniek, ktoré sa nachádzajú v cytoplazme. V závislosti od typu bunky majú rôznu veľkosť a priestorové usporiadanie. Od prostredia sú izolované dvoma fosfolipidovým membránami – vnútornou a vonkajšou. Vonkajšia membrána zaisťuje celistvosť mitochondrie ako organely a je priepustná pre takmer všetky molekuly a malé proteíny. Naopak, vnútorná membrána slúži ako funkčná zložka mitochondrie a prechod iónov a malých molekúl prebieha vďaka membránovým transportným proteínom. Taktiež obsahuje krysty (záhyby), ktoré niekoľkonásobne zväčšujú jej povrch. Funkciou mitochondrií je bunkové dýchanie, kde sa produkuje väčšina bunkového ATP postupnými reakciami v Krebsovom cykle a respiračnom reťazci (Alberts et al., 2005).

Unikátnosť trypanozóm spočíva v tom, že obsahujú iba jednu mitochondriu na bunku (Lukeš et al., 2010). Na úseku mitochondrie sa vyskytuje kinetoplast, ktorý je umiestnený blízko kinetozómu. Ich mitochondriálna DNA (kinetoplastová DNA [kDNA]) je zložená z mini a maxi krúžkov obsahujúcich veľké kvantum DNA. V *T. brucei* majú maxi krúžky veľkosť 23kb a kódujú gény pre mitochondriálne ribozomálne RNA a gény pre proteíny, ktoré sú zapojené do procesu oxidatívnej fosforylácie. Mini krúžky sú veľké iba 1kb a ich úlohou je kódovanie gRNA (guide RNA), ktorá slúži ako templát pri inzercii alebo delícii uridínových zvyškov v maxikruhových transkriptoch (mRNA) procesom nazývaným RNA editovanie (Hines & Ray, 2011).

Trypanozómy sa počas životného cyklu stretávajú s veľmi odlišným prostredím, čomu musia prispôbiť procesy, akými si vyrobia energiu (Smith & Butikofer, 2010). V prostredí bohatom na glukózu (krvné formy *T. brucei*) produkujú ATP bez využitia Krebsovho cyklu a respiračných komplexov III a IV, predovšetkým fosforyláciou na úrovni substrátu v procese glykolýzy (Bakker et al., 1997). V prostredí s nízkym obsahom cukru (hmyzia forma *T. brucei*) sú schopné katabolizovať aminokyseliny a ATP sa generuje cestou oxidatívnej fosforylácie, kedy sú enzýmy Krebsovho cyklu a komplexy respiračného reťazca plne funkčné (Gnipova et al., 2015).

1.4 Glykolýza

Glykolýza je evolučne starodávna metabolická dráha, ktorá konvertuje glukózu na pyruvát (Smith et al., 2017). Glykolytická dráha predstavuje v rámci energetických potrieb pre *T. brucei* veľký význam (Visser & Opperdoes, 1980). U *T. brucei* existuje niekoľko rozdielov medzi glykolytickou dráhou krvných a procyklických foriem (Bakker et al., 1997). V *T. brucei* sa vyskytujú glykozómy (peroxizómové organely), ktoré obsahujú prvých šesť glykolytických enzýmov u procyklickej formy, ale sedem u krvnej formy (Smith et al., 2017). Fosfoglycerát kináza má u krvných foriem glykozomálnu lokalizáciu, a tak sa v glykozóme produkuje 3-fosfoglycerát a fosfoenolpyruvát, čím sa generuje ATP v glykozóme. Naopak, u procyklických foriem má fosfoglycerát kináza cytozolickú lokalizáciu, čím sa ATP a fosfoenolpyruvát vyrábajú v cytozole. Dôvodom výroby ATP v cytozole počas cytoplazmatických krokov je ten, že glykozomálna membrána pre ATP nie je priepustná. (Lamour et al., 2005; Hannaert et al., 2003) (obr. 2).



Obr. 2: Produkcia energie procyklických a krvných foriem *T. brucei* (Smith et al., 2017). Výroba ATP procyklickej formy *T. brucei* s nedostatkom glukózy [A], bohatej na glukózu [B] a krvnej formy [C]. Konečné produkty vzniknuté po štiepení glukózy a prolínu (alanín, sukcinát, acetát, pyruvát) sú vyznačené podčiarknutým písmom. (1a) Glykozomálna fosfoglycerát kináza krvnej formy, (1b) cytozolová fosfoglycerát kináza procyklickej formy, (2) pyruvát-kináza, (3) fosfoenolpyruvát karboxykináza, (4) glykozomálna malát dehydrogenáza, (5) cytozolová fumaráza (na zjednodušenie je táto reakcia zobrazená v glykozóme), (6) glykozomálna fumarátreduktáza, (7) dikináza, (8) sukcinát-CoA transferáza, (9) acetyl-CoA tioesteráza, (10) sukcinyl-CoA syntetáza, (11) oxidáza, (12)

respiračný reťazec, (13) FoF1-ATP syntáza, (14) premena medzi ADP a ATP (Smith et al., 2017).

1.5 Katabolizmus aminokyselín

Keďže trypanozómy nemajú prístup v procyklickom štádiu ku glukóze, vyrábajú si ATP z prítomnosti dostatočného množstva aminokyselín, predovšetkým z prolínu (Lamour et al., 2005) (obr. 2 [A]). Okrem prolínu však využívajú aj katabolizmus iných aminokyselín, akými je treonín alebo leucín, ktoré sú taktiež metabolizované v mitochondrii. Tieto aminokyseliny sa potom napájajú na biosyntézu mastných kyselín, a taktiež môžu vstúpiť do mevalonátovej dráhy k výrobe základných lipidov (Smith et al., 2017). Počas katabolizmu prolínu na koncový produkt alanín sa ATP vyprodukuje premenou sukcinyl-CoA na sukcinát, a taktiež oxidatívnou fosforyláciou, pretože metabolizmus prolínu je naviazaný na dýchací reťazec cez komplex II (Verner et al., 2015). Ak majú ale procyklické formy v prostredí poskytnutú glukózu, prispôbia si svoj metabolizmus tak, že aj v prítomnosti prolínu využívajú glykolýzu (Smith et al., 2017) (obr. 2 [B]).

1.6 Krebsov cyklus

Krebsov cyklus (cyklus kyseliny citrónovej; citrátový cyklus) prebieha v matrici mitochondrie. Za aeróbných podmienok procesom glykolýzy dochádza k premene glukózy na pyruvát, ktorý vstupuje do mitochondrie, kde je enzýmom pyruvát dehydrogenázou konvertovaný na acetyl-CoA. Ten následne vstupuje do citrátového cyklu, kde reaguje s oxalacetátom za vzniku citrátu. Ďalej nasleduje sedem enzymatických reakcií, ktoré zahŕňajú tri dehydrogenázy NAD^+ , jednu dehydrogenázu FAD, dve dekarboxylácie a substrátovú fosforyláciu. Výsledkom oxidácie jednej molekuly acetyl-CoA je energetický výtťažok v podobe dvoch molekúl CO_2 a štyroch molekúl redukovaných koenzýmov (3x NADH_2 , 1x FADH_2). Následne môžu vodíky redukovaných koenzýmov ďalej vstupovať do dýchacieho reťazca (Zubay et al., 1995).

Krvná forma *T. brucei* produkuje ATP v prostredí bohatom na glukózu bez využitia Krebsovho cyklu a respiračných komplexov III a IV, predovšetkým fosforyláciou na úrovni

substrátu. Naopak, procyklické formy plne využívajú ako aj enzýmy Krebsovho cyklu, tak aj všetky komplexy respiračného reťazca. (Bakker et al., 1997; Gnipova et al., 2015).

1.7 Oxidatívna fosforylácia

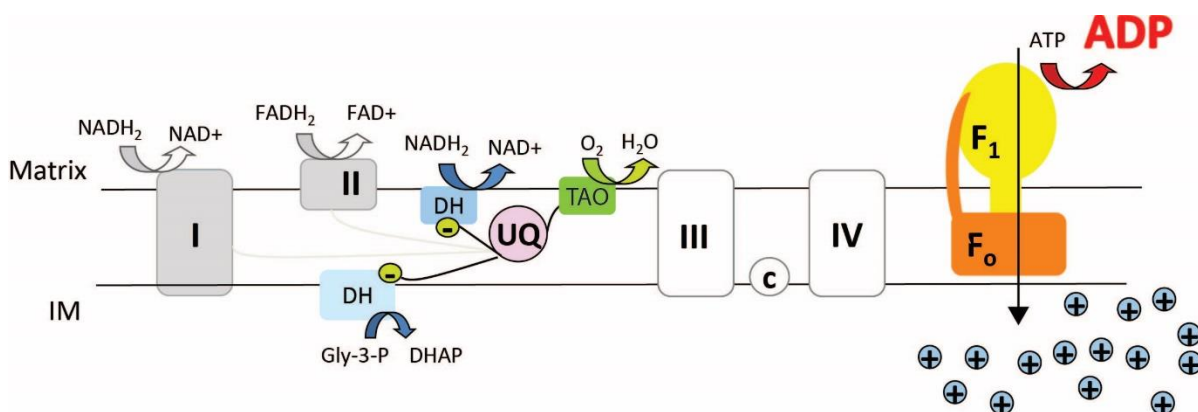
Po odbúraní acetyl-CoA v Krebsovom cykle dochádza k prenosu elektrónových produktov do mitochondriálneho respiračného reťazca, ktorý sa skladá zo štyroch proteínových komplexov I – IV. Prechod elektrónov prebieha postupne od jedného komplexu k ďalšiemu (podľa stúpajúceho redoxného potenciálu), čo zabezpečujú pohyblivé prenášače ubiquinón (Q) a cytochróm (c) a končí sa presunom na kyslík, ktorý sa zredukuje na vodu. Prenos elektrónov je spojený s transportom H^+ cez membránu von z matrix pomocou respiračného komplexu I (NADH-ubichinónreduktáza), III (bc_1 , ubichinol-cytochróm c-reduktáza), IV (cytochróm c-oxidáza), čím vytvárajú elektrochemický protónový gradient (Alberts et al., 2005; Mitchell, 1961).

Komplex I s komplexom II katalyzujú prenos elektrónov z NADH alebo FADH na ubiquinón. Komplex II (SDH, sukcinát-ubichinónreduktáza) je navyše súčasťou Krebsovho cyklu, kde dochádza k premene sukcinátu na fumarát, prenáša elektróny na ďalší komplex a nepodieľa sa na tvorbe protónového gradientu. Komplexom III prechádzajú elektróny z ubiquinolu na rozpustný proteín obsahujúci hemovú skupinu – cytochróm c. Následne komplex IV dokončí celý reťazec prenosom elektrónov z cytochrómu c na kyslík. Prúd elektrónov je spojený s prenosom protónov cez vnútornú mitochondriálnu membránu nepriepustnú pre H^+ , čím vznikajú rozdiely v pH a v distribúcii náboja v mitochondriálnej membráne. Komplex V, nazývaný aj FoF1-ATP syntáza, využíva gradient protónov H^+ (elektrochemická energia; protónová hybná sila) na vnútornej membráne k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu oxidatívnou fosforyláciou (Zubay et al., 1995).

1.7.1 Respiračný reťazec krvných foriem *T. brucei*

I keď u krvných foriem *T. brucei* nie je prítomný Krebsov cyklus a v respiračnom reťazci nie je poskladaný komplex III a IV, stále u nich dochádza k reoxidácii redukovaného kofaktoru NADH, ktorý poskytuje získané elektróny kyslíku (obr. 3). Dýchanie krvných foriem závisí výhradne od prítomnosti alternatívnej oxidázy (TAO). TAO je diiron proteín, vyskytujúci sa aj v niektorých vyšších rastlinách, hubách a jednobunkových organizmoch, ktorý prenáša elektróny z ubiquinolu na molekulárny kyslík za vzniku vody (Chaudhuri et al.,

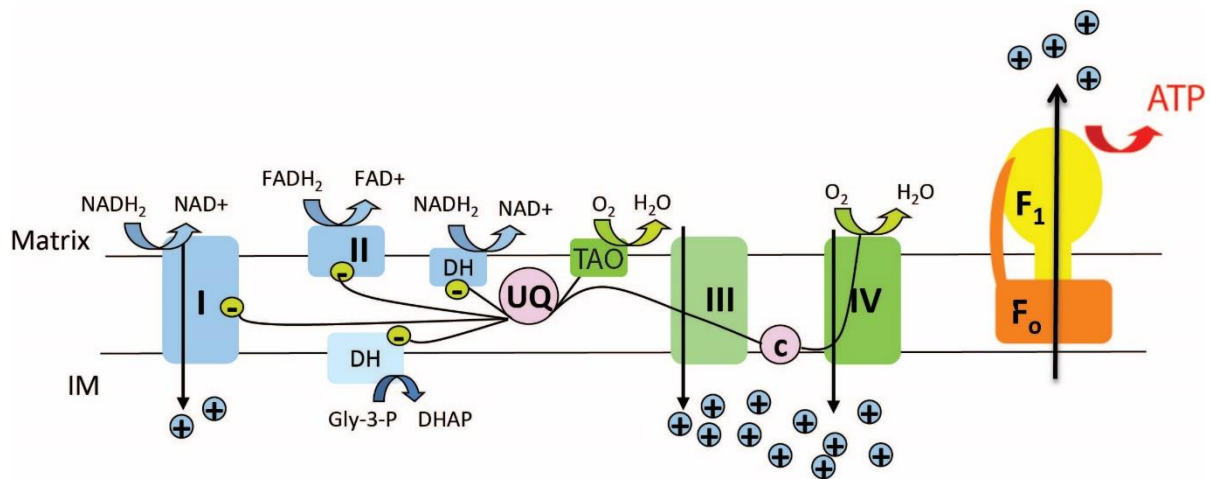
2006). Táto dráha je spojená s aktivitou glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (G3PDH), ktorá katalyzuje premenu glycerol-3-fosfátu na dihydroxyacetón fosfát (Oppendoes et al., 1977). Následne dráha reoxiduje glykolytický glycerol-3-fosfát, čím udržuje glykozomálnu redoxnú rovnováhu (Clarkson et al., 1989). Membránový potenciál však nevytvára táto dráha, ale je to práve FoF1-ATPáza, ktorá vytvára protónový gradient hydrolýzou ATP a je potrebná na udržanie základného mitochondriálneho membránového potenciálu (Schnauffer et al., 2005; Panicucci et al., 2017; Nolan & Voorheis, 1992).



Obr. 3: Respiračný reťazec krvných foriem *T. brucei*. V tomto štádiu komplexy III a IV chýbajú. Alternatívna oxidáza (TAO) zachytáva elektróny a dochádza k premene kyslíku na vodu. V komplexe V dochádza k otočeniu bežnej aktivity z dôvodu tvorby protónového gradientu. Komplex V teda nevyrába ATP, ale naopak ho spotrebováva na výrobu mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP).

1.7.2 Respiračný reťazec procyklických foriem *T. brucei*

U procyklických foriem *T. brucei* je respiračný reťazec vyvinutý ako aj u iných eukaryotov. Na rozdiel od krvných foriem, vďaka prítomnosti respiračných komplexov III a IV, môže prebiehať transport elektrónov dvoma spôsobmi (obr. 4). Na ubiquinóne dochádza k prerozdeleniu elektrónov, ktoré smerujú buď na alternatívnu oxidázu, alebo sú prenášané ďalej cez komplexy III a IV. FoF1-ATPáza využíva membránový potenciál k následnej produkcii ATP (Devenish et al., 2008).



Obr. 4: Oxidatívna fosforylácia procyklických foriem *T. brucei*. V tomto štádiu sú všetky respiračné komplexy prítomné. Prenos elektrónov je sprostredkovaný pomocou alternatívnej oxidázy alebo bežnou dráhou respiračného reťazca.

1.8 Produkcia protilátok proti respiračným komplexom I, III a IV

Aby sa dali mapovať zmeny v abundancii a veľkosti respiračných komplexov I, III a IV, ku ktorým dochádza behom životného cyklu *T. brucei*, ktoré je možno mimikovať *in vitro* (Kolev et al., 2012), je nutné vytvoriť protilátky, ktoré budú špecificky rozpoznávať podjednotky týchto komplexov. Moja práca je súčasťou väčšieho projektu, ktorého cieľom je charakterizovať zmeny v rámci mitochondriálneho metabolizmu v kultúre, ktorá prechádza diferenciáciou *in vitro*. Aby sme mohli sledovať zmeny v rámci komplexov I, III a IV, rozhodli sme sa vytvoriť protilátky proti podjednotke TbRISP komplexu III, podjednotke TbCOXIV komplexu IV a podjednotke TbNDUFA6 komplexu I.

2 Ciele práce

1. Molekulárnym klonovaním zhotovit' expresné plazmidy génov *TbRISP*, *TbCOXIV* a *TbNDUFA6*.
2. Exprimovať a vypurifikovať rekombinantné proteíny TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6 v *E. coli*.
3. Otestovať získané protilátky proti proteínom TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6 pomocou Western blot analýzy na lyzátoch *T. brucei*.

3 Materiály a metódy

3.1 Primery pre amplifikáciu génov *TbRISP*, *TbCOXIV* a *TbNDUFA6*

Pre amplifikáciu génu pomocou PCR boli použité primery pre gény *TbRISP* (Tb927.9.14160), *TbCOXIV* (Tb927.1.4100) a *TbNDUFA6* (Tb927.10.14860). Pre všetky tri gény boli primery navrhnuté za sekvenciou pre mitochondriálnu lokalizačnú signalizáciu (MLS). Tučne vyznačené bázy predstavujú použité restričné miesta pre klonovanie do plazmidov (tab. I).

Tab. I: Primery génov *TbRISP*, *TbCOXIV* a *TbNDUFA6*.

Primer	Sekvencia
TbRISP Fw (BamHI)	5'-CACGGATCCTCCAACCCATTAAGTAAAG-3'
TbRISP Rev (XhoI)	5'-CACCTCGAGCTATAGTTTTCCCAAATATATC-3'
TbCOXIV Fw (BamHI)	5'-CACGGATCCGATCACGACCGCTGGTATGG-3'
TbCOXIV Rev (HindIII)	5'-CACAAGCTTCTAAATCTTGTTTGAGAGC-3'
TbNDUFA6 Fw (BglII)	5'-CACAGATCTGGTTCACCTTCCTATTTTG-3'
TbNDUFA6 Rev (XhoI)	5'-CACCTCGAGCTAAATCTGCGAGACAACCAC-3'

3.2 PCR

Polymerázová reťazová reakcia je metóda, ktorá slúži k amplifikácii určitého úseku molekuly DNA.

Pre každý gén bola vykonaná paralelne PCR reakcia s použitím Taq-Purple DNA polymerázy alebo KOD Hot Start DNA polymerázy. Ďalej sme pokračovali s PCR produktmi amplifikovanými pomocou KOD Hot Start DNA polymerázy z dôvodu jej proofreadingovej aktivity. Reakcie prebiehali v celkovom objeme 50 μ l.

3.2.1 PCR reakcie pre *TbRISP* a *TbCOXIV*

Tab. II: Zloženie PCR reakcie s použitím Taq DNA polymerázy.

10x reakčný pufr s MgCl ₂	5 µl
PCR dNTP mix (každý nukleotid 10mM)	1 µl
5' primer (10 µM)	2,5 µl
3' primer (10 µM)	2,5 µl
Taq DNA polymeráza (1 U/µl)	2,5 µl
Genomová DNA (400 ng/µl)	1 µl
PCR H ₂ O	35,5 µl

Program:

	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatková denaturácia	94°C	3 min	1
Denaturácia	94°C	30 s	34
Annealing	50°C	30 s	
Elongácia	72°C	1 min	
Finálna polymerizácia	72°C	5 min	1
Chladienie	12°C	∞	

Tab. III: Zloženie PCR reakcie s použitím KOD Hot Start DNA polymerázy.

10x reakčný pufr pre KOD Hot Start DNA polymerázu	5 µl
25 mM MgSO ₄	3 µl
dNTPs (každý nukleotid 10 mM)	5 µl
5' primer - 10 µM (10 pmol/µl)	1,5 µl
3' primer - 10 µM (10 pmol/µl)	1,5 µl
KOD Hot Start DNA polymeráza (1 U/µl)	1 µl
Genomová DNA (400 ng/µl)	1 µl
PCR H ₂ O	32 µl

Program:

	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95°C	3 min	1
Denaturácia	94°C	20 s	35
Annealing	50°C	20 s	
Elongácia	70°C	20 s	
Finálna polymerizácia	70°C	5 min	1
Chladienie	12°C	∞	

3.3 DNA elektroforéza

Veľkosť amplifikovaných fragmentov bola overená v 1,5% agarózovom géli. Jeho príprava spočívala v zmiešaní 1,5 g agarózy a 100 ml TAE pufru (20 mM Tris-base, 10 mM kyselina octová, 0,5 mM EDTA pH 8), ktoré boli následne zahriate v mikrovlnnej trúbe. Po vychladnutí bolo do zmesi pridaných 1,5 μ l ethidium bromidu (5 mg/ml) a gél sa nechal stuhnúť v elektroforetickej vani. PCR produkty boli zmiešané s 5 μ l 10x DNA loading dye. Separácia nukleových kyselín prebiehala 30 minút pri elektrickom napätí 60V.

3.4 Izolácia DNA z gélu

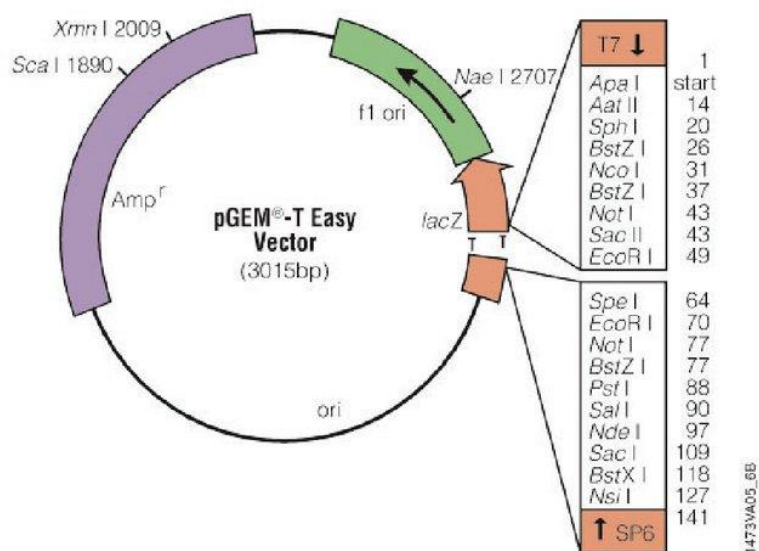
DNA fragmenty boli z agarózového gélu vyrezané pomocou žiletky pod UV-transluminátorom a bola zvážená ich hmotnosť. Izolácia prebehla podľa protokolu GenElute™ Gel Extraction Kit.

3.5 Ligácia

Proces ligácie spočíva v začlenení inzertu pomocou enzýmu DNA ligázy do vektoru (plazmidu).

3.5.1 Ligácia inzertu do vektoru pGEM® - T easy

PCR produkt amplifikovaný pomocou Taq-Purple DNA polymerázy bol zaklonovaný do plazmidu pGEM® - T easy (Promega). Schéma plazmidu je vyobrazená na obrázku (obr. 5). Ligácia prebiehala v 10 μ l (tab. IV).



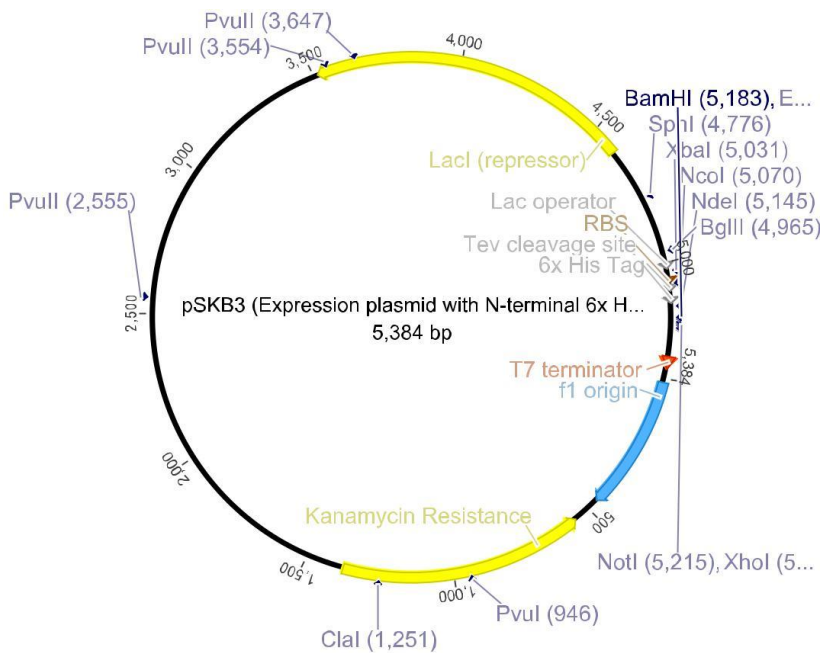
Obr. 5: Mapa komerčného klonovacieho vektoru pGEM® - T easy (Promega).

Tab. IV: Zloženie ligačnej reakcie.

2x Ligačný pufr	5 µl
PCR produkt (68 ng/µl)	4 µl
Plazmid pGEM® - T easy (50 ng/ µl)	0,5 µl
T4 ligáza (3 U/µl)	0,5 µl

3.5.2 Ligácia inzertu do vektoru pSKB3

Pred samotnou ligáciou boli pomocou restriktáz upravené konce vektoru pSKB3 (Novagen) a PCR produktu amplifikovaného pomocou KOD Hot Start DNA polymerázy. Takto upravený PCR produkt mohol byť zaklonovaný pomocou restriktčných miest do plazmidu pSKB3. Schéma plazmidu je vyobrazená na obrázku (obr. 6). Ligácia prebiehala v 10 µl (tab. V).



Obr. 6: Mapa komerčného klonovacieho vektoru pSKB3 (Novagen).

Tab. V: Zloženie ligačnej reakcie.

10x Ligačný pufr	1 μ l
PCR produkt (76 ng/ μ l)	5,5 μ l
Plazmid pSKB3 (100 ng/ μ l)	3 μ l
T4 ligáza (3 U/ μ l)	0,5 μ l

3.6 Transformácia plazmidového vektoru do *E. coli* XL1 Blue

Kompetentné bunky BL21, uchovávané v -80°C , boli rozmrazené na ľade po dobu 20 minút.

K 50 μ l kompetentných buniek bolo pridaných 6 μ l ligačnej zmesi pre pSKB3 (viz. ligácia 3.5.2), ktoré boli znovu ponechané na ľade 20 minút. Potom nasledoval tepelný šok k rozrušeniu bunečnej steny baktérií, ktorý prebiehal vo vodnej lázni 50 sekúnd pri teplote 42°C a následne bola zmes schladená na ľade po dobu 2 minút. Ďalej bolo pridaných 300 μ l SOC média (2% trypton; 0,5% kvasničný extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4 ; 20 mM glukóza) a bunky boli inkubované 45 minút pri 37°C v trepačke. Následne bolo 200 μ l buniek vysiatych na agarózovú misku (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) so selekciou na kanamycín.

K 50 μ l kompetentných buniek bolo pridaných 6 μ l ligačnej zmesi pre pGEM[®] - T easy (viz. ligácia 3.5.1), ktoré boli znovu ponechané na ľade 20 minút. Nasledoval tepelný šok k rozrušeniu stavby baktérií, ktorý prebiehal vo vodnej lázni 50 sekúnd pri teplote 42°C a následne bola zmes schladená na ľade po dobu 2 minút. Ďalej bolo pridaných 500 μ l SOC média. Zatiaľ bolo na agarózovú miskú (100 μ g/ml) so selekciou na ampicilín nanosených 40 μ l X-galu (20 mg/ml; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), z dôvodu využitia modro-bielej selekcie plazmidu pGEM – T easy. 200 μ l buniek, vysiatych na miske, bolo inkubovaných pri 37°C počas celej noci. Nasledujúci deň bolo možné identifikovať dva typy bakteriálnych kolónií – modré kolónie, kde došlo k štiepeniu β -galaktozidázy, a teda neobsahovali náš PCR inzert (gén pre Lac Z v plazmide nebol prerušený) a biele kolónie, v ktorých došlo k prerušeniu génu Lac Z inzerciou DNA do klonovacieho miesta.

3.7 Izolácia plazmidovej DNA

Vybrané biele kolónie na základe modro-bielej selekcie boli pomocou sterilnej pipetovacej špičky prenesené do skúmaviek s 3 ml LB média (1% trypton; 1% NaCl; 0,5% kvasničný extrakt) a 3 μ l ampicilínu (100 μ g/ml). Skúmavky boli počas noci inkubované pri 37°C v trepačke. Čo sa týka kultúry s pSKB3, vybrané biele kolónie boli taktiež prenesené do skúmaviek s 3 ml LB média a 3 μ l kanamycínu (50 μ l/ml) a boli inkubované pri 37°C v trepačke.

Ďalší deň boli plazmidové DNA vyizolované podľa protokolu kitu GenElute[™] HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Koncentrácia plazmidovej DNA bola zmeraná pomocou prístroja Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

3.8 Restriktcia plazmidovej DNA k overeniu prítomnosti inzertu v plazmide

Restriktčná analýza plazmidu pGEM[®] - T easy so zaklonovanými génmi pre *TbRISP* a *TbCOXIV* prebiehala v 50 μ l. Zloženie restriktčných reakcií je uvedené v tabuľkách (tab. VI; tab. VII).

Tab. VI: Zloženie restriktčnej reakcie pre *TbRISP*.

10x green pufr	5 μ l
Restriktčný enzým BamHI *	1 μ l
Restriktčný enzým XhoI *	1 μ l
Plazmidová DNA (3 μ g)	12,6 μ l
MilliQ H ₂ O	30,4 μ l

Tab. VII: Zloženie restriktčnej reakcie pre *TbCOXIV*.

10x green pufr	5 μ l
Restriktčný enzým BamHI *	1 μ l
Restriktčný enzým HindIII *	1 μ l
Plazmidová DNA (3 μ g)	17,5 μ l
MilliQ H ₂ O	25,5 μ l

* množstvo pridaného restriktčného enzýmu bolo stanovené podľa manuálu výrobcu Thermo Scientific.

Restriktčná analýza plazmidu pSKB3 so zaklonovanými génmi pre *TbRISP* a pre *TbCOXIV* prebiehala obdobne, iba namiesto pGEM – T easy bol štiepený pSKB3 plazmid s danými inzertami.

Vzorky boli jemne premiešané a inkubované v termobloku 30 minút pri 37°C. Správnosť vyštiepenia inzertov z plazmidov bola overená v 1% agarózovom géli. Príslušné fragmenty boli vyrezané z gélu a vyizolované pomocou kitu QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

3.9 Sekvenácia

Získané zaligované fragmenty do príslušných plazmidov boli vždy overené pomocou sekvenácie. K sekvenácii boli použité primery navrhnuté z plazmidov v blízkosti inzertu. Vzorky boli odoslané na sekvenovanie Sangerovou metódou, ktorá je vhodná na osekvenovanie krátkych sekvencií jednovláknovej DNA. Výsledkom sú rôzne dlhé sekvencie DNA s určitým poradím nukleotidov, čo nám pomôže vylúčiť mutácie alebo nesprávne konštrukty. Sekvenácia prebiehala vo firme Seqme (SEQme s.r.o.).

3.10 Príprava expresných buniek C41

Sterilnou pipetovacou špičkou boli prenesené zásobné expresné bunky C41 z glycerolovej konzervy, uchováanej v -80°C , do 3 ml LB média bez prítomnosti antibiotika a ponechané počas noci v trepačke pri 37°C . Nasledujúci deň bola kultúra ďalej rozpestovaná vo väčší objem v Erlenmayerovej banke s 25 ml LB média, ktorú sme umiestnili do trepačky pri 37°C , dokým nedosiahla požadovanú absorbanciu pri 600 nm v rozmedzí $\text{OD} = 0,4 - 0,6$. Po dosiahnutí hodnoty bola kultúra stočená v centrifuge s rýchlosťou otáčok 8000 rpm, pri 4°C na 10 minút. Bakteriálny pelet sme rozsuspendovali v 10 ml studeného 0,1 M CaCl_2 . Zmes bola ponechaná 30 minút na ľade, stočená v centrifuge s rýchlosťou otáčok 8000 rpm, pri 4°C na 10 minút, a znovu bol pelet rozsuspendovaný v studenom 0,1 M CaCl_2 , teraz však s objemom 4 ml. Takto pripravené expresné bunky môžu byť po dobu 10 dní uskladnené v chladničke, aby zostali kompetentné pre transformáciu pripravených plazmidov.

3.11 Transformácia do expresných buniek C41

Na transformáciu bolo použitých 100 μl expresných buniek C41 a 1 μl plazmidu, ktoré boli ponechané približne 30 minút na ľade. Tepelný šok bol vykonaný pri 42°C na 50 sekúnd a bunky boli hneď schladené na ľade po dobu 2 minút. Do zmesi bolo pridaných 170 μl SOC média a zmes bola umiestnená do trepačky pri 37°C približne na 45 minút. Potom bolo zo zmesi odobraných 250 μl , ktoré boli vysiate na agarózové misky so selekciou na kanamycín (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a boli ponechané v inkubátore počas celej noci pri 37°C . Druhý deň boli sterilnou pipetovacou špičkou nabrané kolónie a vhozené do skúmaviek s 3 ml LB média, ktoré boli umiestnené do trepačky na 30 minút pri 37°C .

3.12 Expresia rekombinantných proteínov

Z narastených kultúr po transformácii bolo zo skúmaviek odpipetované množstvo 1 ml do Erlenmayerových baniek s 20 ml LB média a s 20 μ l antibiotika kanamycínu (50 μ l/ml) pre každý klon. Následne boli skúmavky inkubované v trepačke pri 37°C, dokým sa nepodarilo získať požadovanú absorbanciu pri 600 nm v rozmedzí OD = 0,4 – 0,6. Z kultúr o požadovanej absorbancii bol pred indukciou odpipetovaný 1 ml suspenzie pre porovnávaciu analýzu proteínov z bakteriálneho lyzátu pred a po indukcii expresie daného proteínu.

3.12.1 Príprava lyzátu

Odpipetovaný 1 ml bakteriálnej kultúry bol stočený v centrifuge pri 4°C, 5000 rpm na 5 minút. Pelet bol rozsuspendovaný v 100 μ l 1xPBS (5,6 mM (Na₂HPO₄*12H₂O); 0,145 M NaCl; 3,6 mM NaH₂PO₄*2H₂O) a bolo pridaných 50 μ l 3xSDS nanášacieho pufru (6% sodium dodecyl sulfát; 0,02% bromfenolová modrá; 30% glycerol; 150 mM Tris-Cl pH 6,8; 300 mM dithiotreitol). Vzorky boli denaturované pri 97°C 8 minút.

3.12.2 Testovanie rozpustnosti proteínu

Do zostatkovej bakteriálnej kultúry bolo pridaných 200 μ l 100 mM IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid), čím došlo k indukcii expresii proteínu. Kultúry boli inkubované v trepačke pri 37°C, pričom z každej kultúry boli zozbierané vzorky dvakrát po 1 ml v čase 1h a 3h od indukcie. Následne boli kultúry stočené na centrifuge pri 4°C, 5000 rpm na 5 minút. Pelety boli rozsuspendované v 200 μ l Bug Buster Master Mix (Novagen), čo je zmes enzýmov, pomocou ktorých je možné ľahko a rýchlo zlyzovať bunky a stanoviť lokalizáciu proteínu s 20 μ l 10x proteázového inhibítora (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) (Sigma-Aldrich). Vzorky boli hodinu na rotátore, a potom boli stočené v centrifuge pri 4°C, 16000 rcf na 20 minút. Získali sme tak solubilnú frakciu (proteíny vyskytujúce sa v cytozole), kedy sme do supernatantu pridali 100 μ l 3xSDS nanášacieho pufru a insolubilnú frakciu (proteíny prítomné v inklúzných telieskach), kedy sme pelet rozsuspendovali v 200 μ l 1xPBS a pridali doň 100 μ l 3xSDS nanášacieho pufru. Vzorky boli pred nanesením na 12% akrylamidový gél zahriate na termobloku pri 97°C na 8 minút.

3.13 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovom géli patrí medzi metódy, ktorá slúži k separácii proteínov na základe ich molekulovej hmotnosti. Pred nanesením vzoriek na gél je potrebné proteíny denaturovať použitím SDS (sodiumdodecylsulfát), DTT (ditiotritol) a zahratím na teplotu približne 97°C. Rýchlosť prechodu proteínov cez gél závisí od ich veľkosti – väčšie sa pohybujú pomalšie a nachádzajú sa bližšie k začiatku, naopak menšie sa pohybujú skrz gél rýchlejšie a dostanú sa ďalej. Podľa veľkosti proteínov sa pripravujú gély o rôznej hustote. Pri našej analýze bol použitý 12% akrylamidový gél.

Aparatúra pre SDS – PAGE bola umytá 100% etanolom. Po zostavení aparatúry bol medzi sklíčka naliaty 12% separačný akrylamidový gél (2 ml H₂O; 2,4 ml 30% akrylamid mix, 1,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 60 µl 10% SDS; 60 µl 10% APS; 6 µl TEMED) a aby sme sa zbavili nechcených bubliniek na povrchu, pridali sme trochu butylalkoholu. Po stuhnutí gélu sme zvyšný butylalkohol vyliali a mohli sme naň naliať zaostrujúci gél (1,7 ml H₂O; 420 µl 30% akrylamid mix; 315 µl 1 M Tris pH 6,8; 25 µl 10% SDS; 25 µl 10% APS; 5 µl TEMED). Po stuhnutí zaostrujúceho gélu bola aparatúra s gémi zaliata 1xSDS elektroforetickým pufrom (25 mM Tris; 192 mM glycín; 0,1% SDS) a do jamiek boli po zahriatí na termobloku pri 97°C na 8 minút, nanesené vzorky po 20 µl so 4 µl proteínového markeru (Prestained protein ladder) (Thermo Scientific). Elektroforéza bola spustená prvých 20 minút na 90V, kedy proteínové vzorky postupujú – zaostrujú sa v prvej časti a neskôr sme veľkosť elektrického napätia zvýšili na 120V, kde sa rozdeľujú na separačnom géli podľa veľkosti.

Po elektroforetickej separácii boli vizualizované proteíny priamo v géli pomocou Coomassie blue (0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% kyselina octová, 50% metanol) približne 1 hodinu. Gél bol následne odfarbený odfarbovacím roztokom (7% metanol, 5% kyselina octová) a výsledný patern bol vyfotený pomocou ChemiDoc™ MP Imaging system od Bio-Rad.

3.14 Purifikácia rekombinantných proteínov

Narastená bakteriálna kultúra (500ml) bola preliata do kónických kyviet a následne stočená v predchladenej centrifuge na 4°C s rýchlosťou otáčok 4000 g na 15 minút. Po stočení bol supernatant vyliaty, pelet bol rozsuspendovaný pomocou 40 ml 1xPBS a bunky boli stočené v centrifuge v 4°C s rýchlosťou 4000 g na 10 minút. Následne boli bunky lyzované

tak, že pelet bol rozpustený v 30 ml STE pufru (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, MilliQ H₂O), v ktorom bola predom rozpustená 1 tableta proteázových inhibítorov (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) (Sigma-Aldrich). Po zvortexovaní bolo ďalej pridaných 30 ml STET pufru (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% Triton X-100; MilliQ H₂O), 10 ml lyzozýmu (10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mg/ml lyzozým, MilliQ H₂O), ktorý lyzuje bakteriálne bunky a po premiešaní boli vzorky ponechané 30 minút na ľade, a potom 10 minút na rotátore pri teplote 4°C. Následne bola použitá DNáza s cieľom rozštiepiť molekuly deoxyribonukleovej kyseliny pridaním 1 ml 1M MgCl₂ a 17,5 µl DNázyI (10mg/ml). Vzorky boli ponechané na rotátore pri teplote 4°C na 10 minút, a potom boli stočené v centrifuge na 30 minút v 4°C, rýchlosťou 10000 g. Keďže sa proteín nachádzal v pelete, musel byť rozsuspendovaný v 20 ml 1xPBS a v 1,5 ml 20% sarcosylu, ktorý rozrušuje inklúzne telieska, a tým z nich uvoľňuje exprimovaný proteín. Zmes sa nechala rotovať v 4°C do nasledujúceho dňa. Následne bola stočená v centrifuge rýchlosťou 10000 g pri 4°C na 30 minút. Supernatant bol na ľade prefiltrovaný pred následnou chromatografiou pomocou sterilnej injekčnej striekačky cez 45 µm filter.

3.14.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC je chromatografická technika používaná na separáciu analytov vo vzorkách s následnou indikáciou ich prítomnosti či koncentrácie. Počas purifikácie bol použitý pufr A (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 25 mM imidazol; 10% glycerol; 20% sarkosyl) a pufr B (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 500 mM imidazol; 10% glycerol; 20% sarkosyl). Priebeh chromatografie je založený na presune analytov cez stacionárnu a mobilnú fázu, kde dochádza k mnohým typom interakcií – v našom prípade sa využíva interakcia proteín-kovový ión. Jednotlivé zložky vzorky ďalej prichádzajú na kolónu, s ktorou reagujú. V našom prípade sa jednalo o proteíny s hexahistidínovou kotvou na N terminálnom konci, ktoré interagovali s Ni²⁺ v kolónke HisTrap™ HP (GE Healthcare) - špecificky sa teda naviažu His-tagované proteíny na kolónke a zbytok lyzátu pretečie. Zvyšovaním koncentrácie imidazolu, ktorý je obsiahnutý v pufr, dôjde k eluovaniu cieľového proteínu z kolónky, pretože jeho afinita k časticiam kovu je vyššia než má histidín, a tým je his-proteín uvoľnený z kolónky. Proteín je postupne zozbieraný do jednotlivých frakcií a jeho prítomnosť vieme odsledovať vďaka UV detektoru, ktorý nám poskytne grafický záznam, chromatogram, v programe Primeview. Purifikácia rekombinantného proteínu bola vykonaná na prístroji ÄKTAprime plus (GE Healthcare).

Frakcie vypurifikovaného proteínu boli overené pomocou SDS PAGE elektroforézy zmiešaním 50 µl elučnej frakcie s 25 µl 3x SDS nanášacieho pufru, následným zahriatím na termobloku s teplotou 97°C na 8 minút a nanesením na 12% akrylamidový gél.

3.15 Dialýza

Dialýza je metóda, vďaka ktorej je možné očistiť vypurifikovaný cieľový proteín od nežiadúcich látok cez semipermeabilnú membránu. V našom prípade sa jednalo o odstránenie imidazolu a sarkosylu a upravenie pufru, v ktorom je proteín, aby bol vhodný pre imunizáciu kráľika.

Pred použitím bola membrána (membra-Cel dialysis tubing od Serva, cat. #44313 s MWCO 7 kDa) prevarená v pufri s obsahom 10 mM EDTA pH 8 (10 mM Tris pH 7,2; 10 mM EDTA pH 8) a následne uchovaná pri teplote 4°C v pufri 1 mM EDTA pH 8 (10 mM Tris pH 7,2; 1 mM EDTA pH 8). Po premytí dialyzačnej membrány destilovanou vodou boli do nej prepipetované jednotlivé frakcie s najvyššou koncentráciou daného proteínu. Membrána bola pevne uzavretá štipcami, namočená do 500 ml pufru 1 (20 mM Na₃(PO₄)_x; 500 mM NaCl; 250 mM imidazol; 0,5% sarcosyl) a ponechaná na magnetickej miešačke pri 4°C 1 hodinu. Potom bola membrána vložená do 500 ml pufru 2 (20 mM Na₃(PO₄)_x; 500 mM NaCl; 0,5% sarcosyl) a ponechaná na magnetickej miešačke pri 4°C počas celej noci. Nasledujúci deň bola membrána vložená do 1000 ml pufru 3 (20 mM Na₃PO₄; 125 mM NaCl; 0,5% sarcosyl) a ponechaná na magnetickej miešačke pri 4°C 2 hodiny. Zdialyzovaný proteín bol prepipetovaný do ependorfiek a po stanovení jeho koncentrácie bol následne zmrazený v tekutom dusíku a skladovaný v -80°C.

3.16 Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovej metódy

Bradfordova metóda slúži ku kolorimetrickému stanoveniu koncentrácie proteínov v roztoku. Táto metóda využíva posun absorbného maxima Coomassie blue po väzbe na proteín. V kyslom prostredí tvorí s proteínmi stabilné komplexy a po väzbe s nimi dochádza k zmene farby, pričom vo všeobecnosti platí, čím je koncentrovanejší proteín, tým je farba sýtejšia. Ako kalibračný proteín sa používa bovinný sérový albumín (BSA).

Najprv bola pripravená 10-stupňová kalibračná rada s koncentraciami od 100 ug/ml do 1000 ug/ml BSA, ktorý sa riedil s pufrom 3 z dialýzy (v rovnakom pufri ako bola stanovovaná vzorka). Do ependorfiek bol prepipetovaný cieľový proteín z membrány po dialýze a rozriedený pufrom 3 z dialýzy 10x, 100x a 500x. Do 96-jamkovej doštičky boli všetky vzorky nanášané po 20 µl a do každej bolo pridaných ešte 200 µl Coomassie blue (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad), riedenej v pomere 1:5. Doštička bola prikrytá alobalom z dôvodu zabránenia prenikaniu svetla a následne bola inkubovaná 10 minút pri izbovej teplote. Absorbancie boli zmerané na prístroji Tecan Infinite M200 Microplate reader (Schoeller) s nastavenou absorbanciou 595 nm. Zo získaných hodnôt absorbancií bola v programe Microsoft Office Excel prepočítaná skutočná koncentrácia jednotlivých vzoriek proteínov pomocou kalibračnej krivky, stanovenej zo známych koncentrácií BSA.

3.17 Produkcia protilátok

Produkcia polyklonálnych protilátok bola vykonaná imunizáciou s danými proteínmi (antigénmi) opakovane počas niekoľkých týždňov. Imunizácia pre získanie polyklonálnych protilátok prebehla vo firme Davids Biotechnologie GmbH v Nemecku. Na jednu imunizačnú schému bolo treba zaslať 0,2-0,6 mg proteínu na samotnú imunizáciu a zhruba 2 mg proteínu na afinitnú purifikáciu získanej protilátky.

3.18 Western blot

Táto analytická metóda je využívaná na detekciu špecifického proteínu v zmesi s ďalšími proteínmi. Prebieha v troch základných krokoch, akými sú: separácia proteínov, ich prenos a následná detekcia.

Zatiaľ čo počas SDS-PAGE v akrylamidovom 12% géli došlo k separácii proteínov, bola aktivovaná polyvinylfluoridová membrána (BioTRace™ PVDF–GeneTiCA) v roztoku metanolu na približne 40 sekúnd, potom bola ponorená na 2 minúty do destilovanej vody a nakoniec do transférového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycín, 20% metanol) na 10 minút. Následne bol zostavený prenosný sendvič pozostávajúci z anódy, hubky, filtračného papiera, membrány, gélu, filtračného papiera, hubky, katódy, ktorý bol vložený do prenosnej aparatury, kde sa proteíny preniesli na membránu pod elektrickým prúdom 90V za 90 minút. Membrána bola počas noci blokovaná v 5% roztoku sušeného mlieka v 1x PBS-T (1xPBS

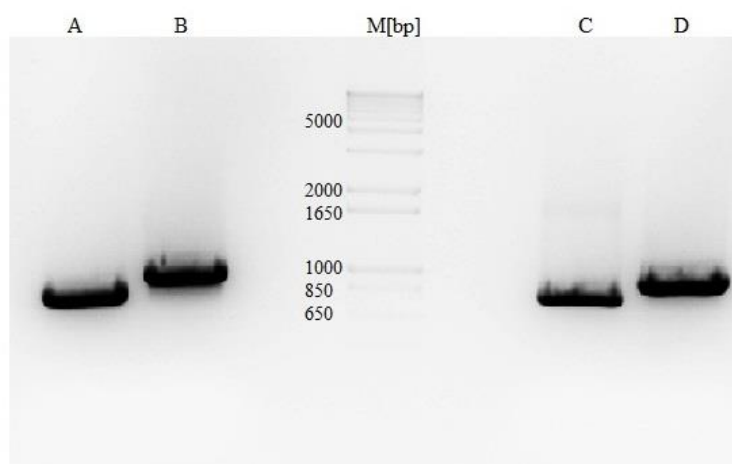
s 0,05% Tween), čím sa zaplnili voľné miesta na membráne, aby sa protilátka mohla viazať len na svoj špecifický antigén. Nasledujúci deň došlo k samotnej detekcii, kedy bola membrána inkubovaná 1 hodinu s primárnou protilátkou, v našom prípade myšou protilátkou α -His (Invitrogen), v pomere riedenia 1:2000, ktorá sa viazala k epitopu (His-tag) nami hľadaného proteínu. Ďalej bola premytá 1x 15 minút a 3x 5 minút v 1xPBS-T a inkubovaná 1 hodinu so sekundárnou protilátkou, kozia anti myšia (α -Mouse IgG HRP Conjugate, BioRad), v pomere riedenia 1:2000, ktorá sa viazala na primárnu protilátku. V prípade testovania protilátok proteínov TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6 boli primárne protilátky riedené v pomere 1:500 a ako sekundárna protilátka bola použitá kozia anti králičia, v pomere riedenia 1:2000. Sekundárne protilátky obsahovali konjugovaný reportérový enzým, v našom prípade horseradish peroxidase (HRP), vďaka ktorému bolo možné proteíny vizualizovať pomocou ECL substrátu (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). Ten využíva detekovanie na základe chemiluminiscencie, pri ktorej je ako substrát použité činidlo peroxidu, zmiešané s činidlom luminolu v pomere 1:1. Takto pripravený substrát bol nanosený na membránu po dobu 1 minúty a následne bola membrána vyfotená pomocou ChemiDoc™ MP Imaging system od Bio-Rad.

4 Výsledky

4.1 Amplifikácia úsekov DNA *TbRISP*, *TbCOXIV* a *TbNDUFA6* génov

Pomocou PCR boli amplifikované cds-kódovacie oblasti génu *TbRISP* (Tb927.9.14160), *TbCOXIV* (Tb927.1.4100) a *TbNDUFA6* (Tb927.10.14860) s použitím Taq DNA polymerázy či KOD Hot Start DNA polymerázy. K amplifikácii požadovaného úseku génu *TbRISP* boli použité syntetické primery Rieske-fw a Rieske-rev (viz. prílohy kap. 7). Pre gén *TbCOXIV* boli použité syntetické primery trCOIV-fw a trCOIV-rev (viz. prílohy kap. 7). K amplifikácii požadovaného úseku génu *TbNDUFA6* boli použité syntetické primery NDUFA6-fw a NDUFA6-rev (viz. prílohy kap. 7). V prípade génu *TbNDUFA6* bol použitý enzým BglII, ktorý tvorí komplementárne konce k restričnému miestu BamHI. Restričný enzým BamHI nemohol byť použitý, pretože by vo vnútri štiepil kódujúcu sekvenciu génu *TbNDUFA6*. Dĺžka PCR produktov bola overená na 1,5% agarózovom géli s očakávanou veľkosťou 832 bp pre *TbRISP* a 945 bp pre *TbCOXIV* (obr. 7). Klonovanie génu *TbNDUFA6* som nevykonávala ja, ale dostala som už hotový pSKB3 plazmid, s ktorým som ďalej pracovala.

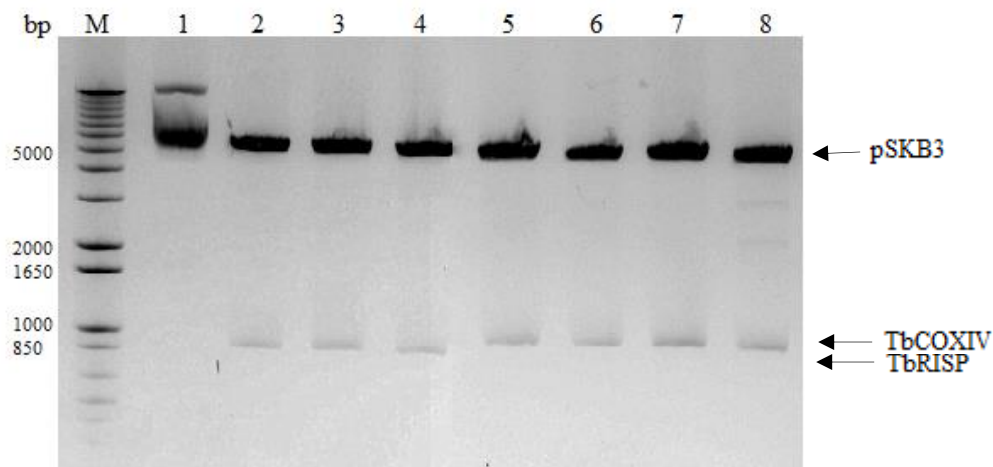
Všetky tri proteíny sú prítomné v mitochondriách, a preto obsahujú MLS (a mitochondrial localization signal). MLS boli detekované pomocou softwaru SignalP 4.1 Server, MitoProtI a iPSORT. Pri navrhovaní primerov na zaklonovanie všetkých génov do plazmidov (v našom prípade do pGEM - T easy alebo pSKB3) boli forward primery navrhnuté až za predikovanú MLS – pre *TbRISP* predikovaná 82 bp, pre *TbCOXIV* 132 bp, pre *TbNDUFA6* 216 bp.



Obr. 7: PCR úseku génov *TbRISP* a *TbCOXIV* s použitím Taq DNA polymerázy a KOD Hot Start DNA polymerázy. Písmená A a B označujú amplifikované fragmenty s použitím KOD Hot Start DNA polymerázy génu *TbRISP* (A) a *TbCOXIV* (B), písmená C a D označujú fragmenty nasyntetizované Taq DNA polymerázou génu *TbRISP* (C) a *TbCOXIV* (D). Písmeno M označuje marker (1 Kb Plus DNA ladder) (Invitrogen).

4.2 Klonovanie do vektorov a overenie správnosti pomocou restrikčnej analýzy

Fragmenty z 1,5% agarózového gélu (obr. 7) boli vyizolované pomocou QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), prečistené pomocou Gen EluteTM PCR-Clean-up Kit (Sigma) a následne zaklonované do plazmidov pGEM[®] - T easy (fragmenty amplifikované Taq DNA polymerázou) či pSKB3 (fragmenty amplifikované KOD Hot Start DNA polymerázou s restrikčne upravenými koncami) a transformované do buniek *E. coli* XL1-blue. Primárne sme pokračovali s klonmi amplifikovanými KOD Hot Start DNA polymerázou a s plazmidom pGEM[®] - T easy sme ďalej už nepokračovali. Z narastených bunečných kolónií bola vyizolovaná plazmidová DNA pomocou GenEluteTM HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma), ktorá bola následne naštiepená restrikčnými enzýmami BamHI, XhoI pre *TbRISP* a BamHI, HindIII pre *TbCOXIV*, za účelom overenia správnosti vloženia príslušného inzertu do vektoru. Restriktcia bola overená na 1% agarózovom géli (obr. 8). Klonovanie bolo úspešné a všetky plazmidy obsahovali príslušný inzert okrem kolónie č. 1. Klony boli taktiež overené pomocou sekvenácie za použitia primerov nasadajúcich na plazmidovú DNA pred a za vloženým inzertom.



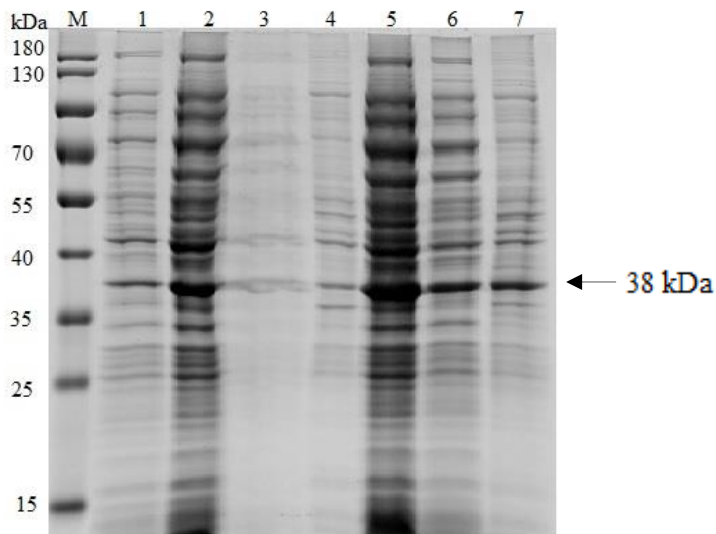
Obr. 8: Restriekčná analýza klonov pSKB3 vektoru. Čísla 1-8 predstavujú jednotlivé izolácie plazmidovej DNA z bakteriálnych klonov: 1-4 pre TbRISP s očakávanou veľkosťou okolo 832 bp, 5-8 pre TbCOXIV s očakávanou veľkosťou 945 bp. Všetky klony okrem klonu č.1 boli pre inzert pozitívne. Písmeno M označuje marker (1 Kb Plus DNA ladder) (Invitrogen).

4.3 Expresia a testovanie rozpustnosti rekombinantných proteínov

K overeniu expresie rekombinantných proteínov bola vykonaná pilotná expresia proteínov TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6.

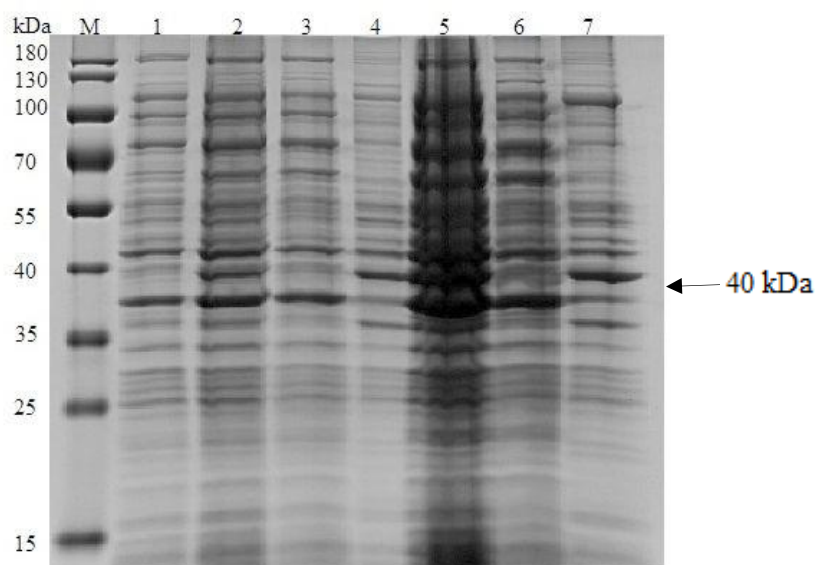
Po transformácii plazmidov do expresných buniek C41 boli kolónie namnožené v LB médiu, kým nedosiahli absorbanciu v rozmedzí $OD = 0,4 - 0,6$. Následne bolo do bakteriálnych kultúr pridané IPTG (finálna koncentrácia 1mM) na indukciu expresie proteínu. Neindukované a indukované bakteriálne lyzáty boli nanosené na 12% akrylamidový gél a následne boli nafarbené pomocou Coomassie blue (obr. 9; obr. 10; obr. 11).

Na obrázku 9 je znázornená expresia rekombinantného TbRISP proteínu z dvoch kolónií. Do prvej jamky bol nanosený neindukovaný bunečný lyzát v čase 0h a do ostatných jamiek boli nanosené vzorky po 1h a 3h indukcií. Prúžky pre solubilnú a insolubilnú vzorku sú približne rovnako hrubé, z čoho sa dá očakávať výskyt proteínov aj v cytozole, aj v inklúzných telieskach.



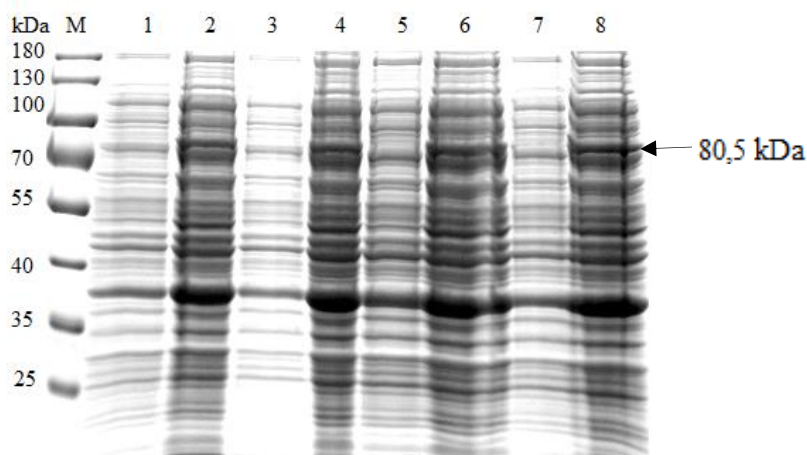
Obr. 9: Expresia rekombinantného TbRISP proteínu. Číslo 1 označuje neindukovaný bunečný lyzát, čísla 2 a 5 označujú bunečný lyzát indukovaný po 1h a 3h, čísla 3 a 6 označujú vzorky pre solubilnú časť a čísla 4 a 7 označujú vzorky pre insolubilnú časť. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific).

Na obrázku 10 je znázornená expresia rekombinantného TbCOXIV proteínu. Do prvej jamky bol nanosený neindukovaný bunečný lyzát v čase 0h a do ostatných jamiek boli nanesené vzorky po 1h a 3h indukcií. Prúžok, ktorý odpovedá insolubilným vzorkám 4 a 7, je omnoho výraznejší než v solubilných vzorkách 3 a 6, z čoho vyplýva lokalizácia proteínov v inklúzných telieskach.



Obr. 10: Expresia rekombinantného TbCOXIV proteínu. Číslo 1 označuje neindukovaný bunecný lyzát, čísla 2 a 5 označujú bunecný lyzát indukovaný po 1h a 3h, čísla 3 a 6 označujú vzorky pre solubilnú časť a čísla 4 a 7 označujú vzorky pre insolubilnú časť. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific).

Na obrázku 11 je znázornená expresia rekombinantného TbNDUFA6 proteínu. Boli testované štyri kolónie, kedy do nepárnych jamiek boli nanesené ich neindukované formy v čase 0h, do párnych jamiek boli nanesené ich indukované formy po 3h. Expresia 80,5 kDa proteínu nebola na prvý pohľad výrazná, preto sme vykonali overenie expresie pomocou Western blot analýzy, pri ktorej bola použitá protilátka proti His-tag, ktorú náš proteín obsahoval. Veľkosť exprimovaného proteínu po vizualizácii odpovedala očakávanej veľkosti 80,5 kDa (obr. 12).



Obr. 11: Expresia rekombinantného TbNDUFA6 proteínu. Čísla 1, 3, 5, 7 označujú neindukované vzorky štyroch rôznych kultúr v čase 0h, čísla 2, 4, 6, 8 označujú indukované vzorky kultúr po 3h. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific).

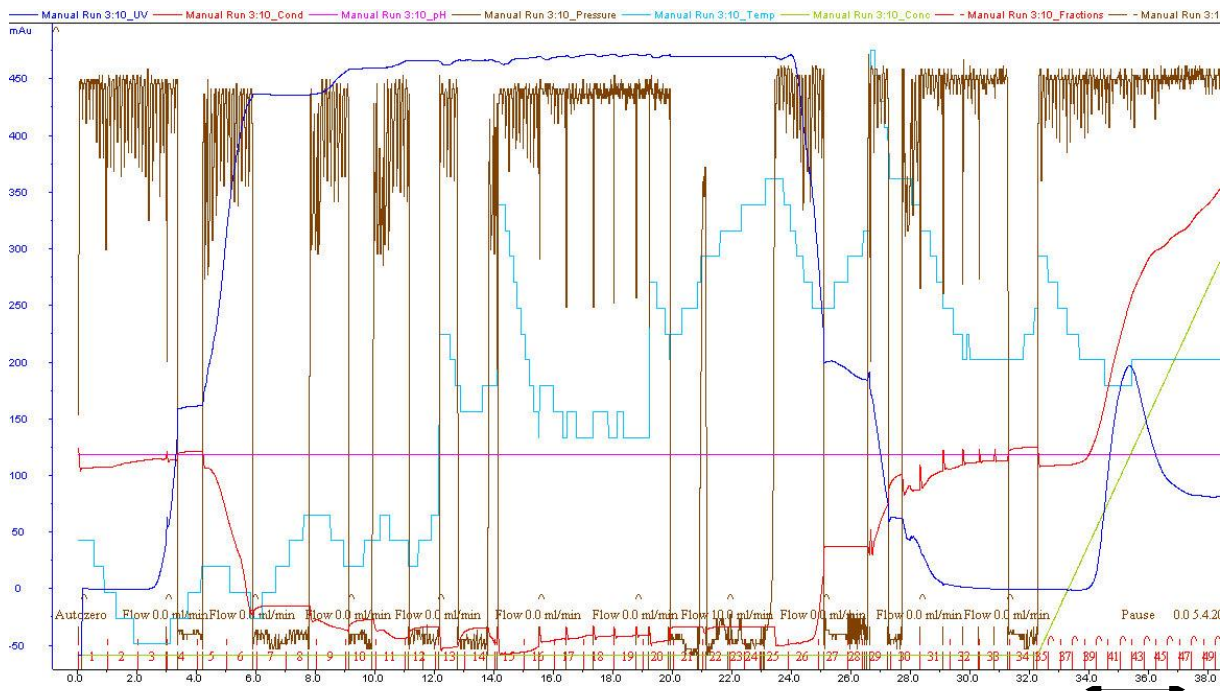


Obr. 12: Western blot - overenie prítomnosti proteínu v lyzáte. Číslo 1 označuje neindukovanú vzorku v čase 0h, číslo 2 označuje indukovanú vzorku po 1h a číslo 3 označuje indukovanú vzorku po 3h. Indukované vzorky boli vizualizované protilátkou anti-His-tag. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific).

4.4 Purifikácia rekombinantných proteínov TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6

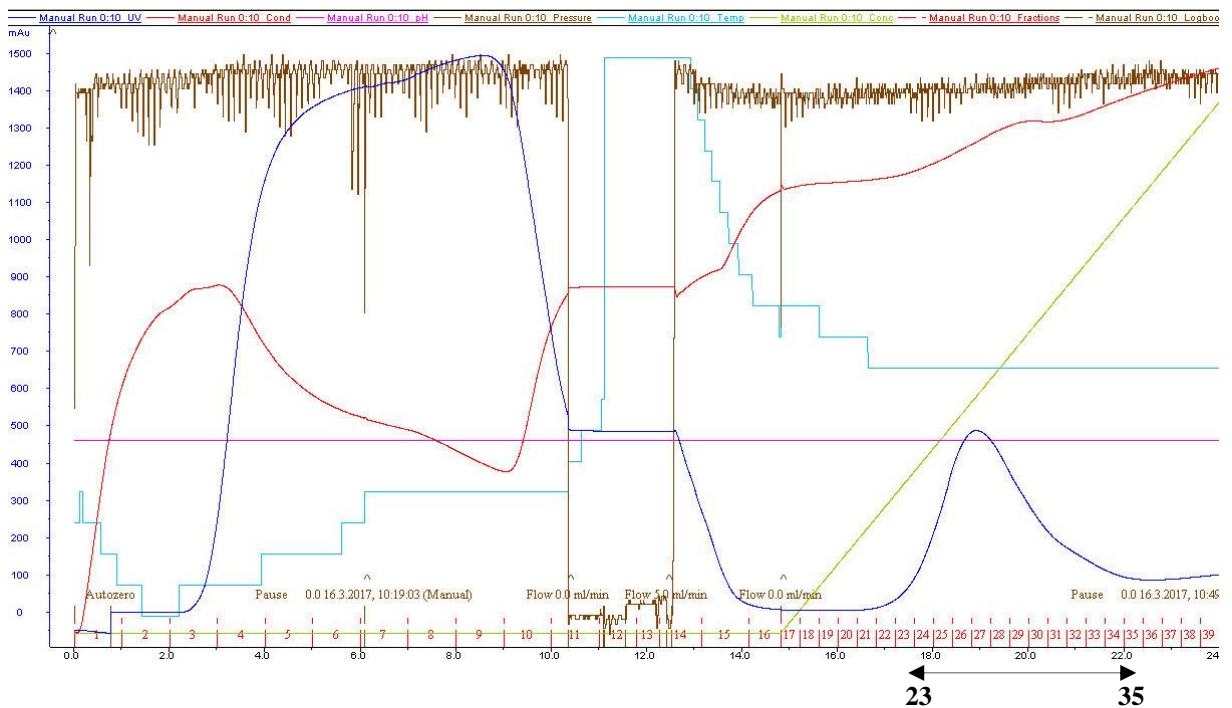
Po pozitívnej pilotnej expresii proteínov v expresných bunkách C41 boli bakteriálne bunky indukované vo väčšom množstve LB média (0,5 l), neskôr boli zlyzované lyzozýmom, a keďže sa proteíny vyskytovali v pelete – v inklúzných telieskach, museli podstúpiť solubilizáciu pomocou sarkosylu. Proteíny boli následne purifikované cez Ni²⁺ kolónu na prístroji ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Celý priebeh purifikácie bol zaznamenávaný UV detektorom s vytvorením grafického záznamu v programe Primeview (obr. 13; obr. 14; obr. 15). Jednotlivé elučné frakcie boli nanosené na 12% akrylamidový gél, ktorý bol vizualizovaný pomocou Coomassie blue (obr. 16; obr. 17; obr. 18). S vypurifikovanými proteínmi bola vykonaná dialýza s následným stanovením koncentrácie Bradfordovou metódou.

Na obrázkoch 13, 14 a 15 je vyobrazený grafický záznam proteínov TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6. Modrá čiara znázorňuje hodnoty UV detektoru a zelená čiara zobrazuje hodnoty imidazolu, nachádzajúceho sa v pufri B. Priebeh purifikácie začína ustálením podmienok, následne dochádza k adsorpcii vzorky na kolónu, elúcii nenaviazaného materiálu a zvyšovaním koncentrácie imidazolu dôjde v určitom momente k elúcii naviazaného proteínu. Frakcie boli zbierané po 2 ml do predom pripravených skúmaviek.



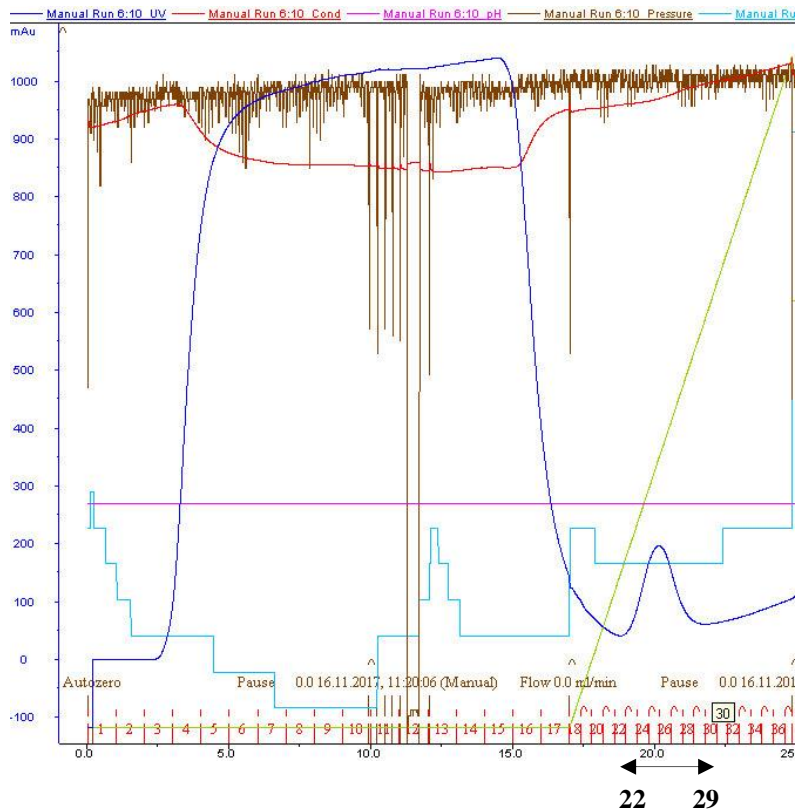
39 47

Obr. 13: Grafický záznam z purifikácie proteínu TbRISP. Podľa hodnôt UV detektoru bola najväčšia koncentrácia eluovaného proteínu vo frakciách skúmaviek 39-47.



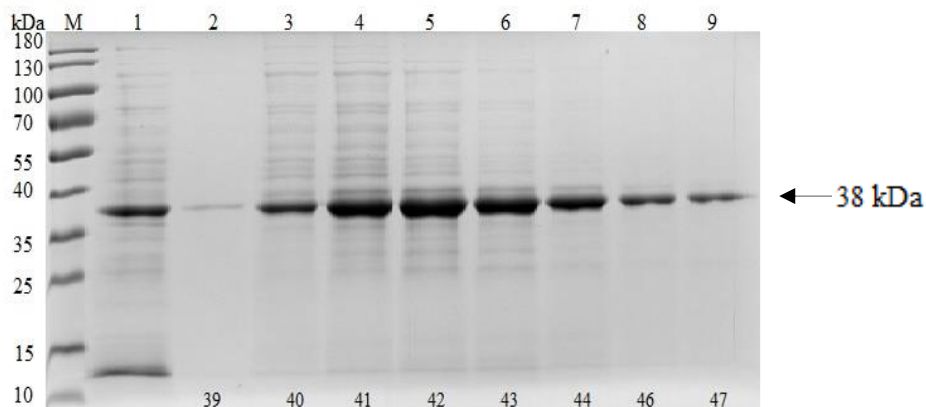
23 35

Obr. 14: Grafický záznam z purifikácie proteínu TbCOXIV. Podľa hodnôt UV detektoru bola najväčšia koncentrácia eluovaného proteínu vo frakciách skúmaviek 23-35.

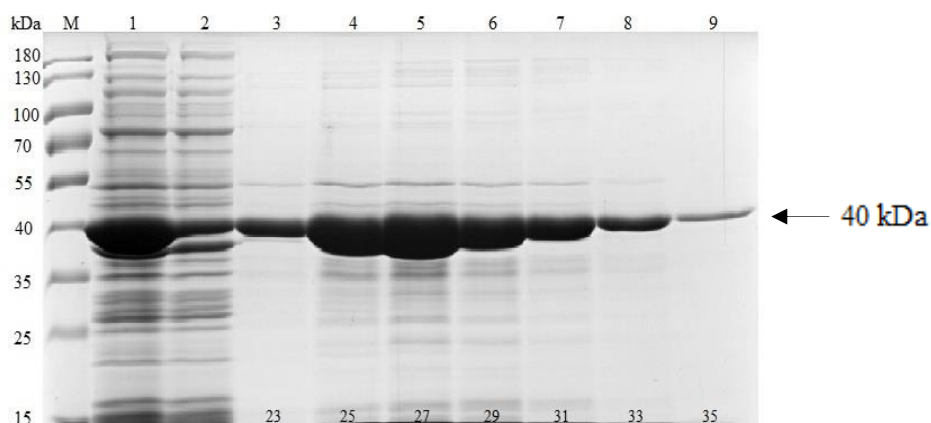


Obr. 15: Grafický záznam z purifikácie proteínu TbNDUFA6. Podľa hodnôt UV detektoru bola najväčšia koncentrácia eluovaného proteínu vo frakciách skúmaviek 22-29.

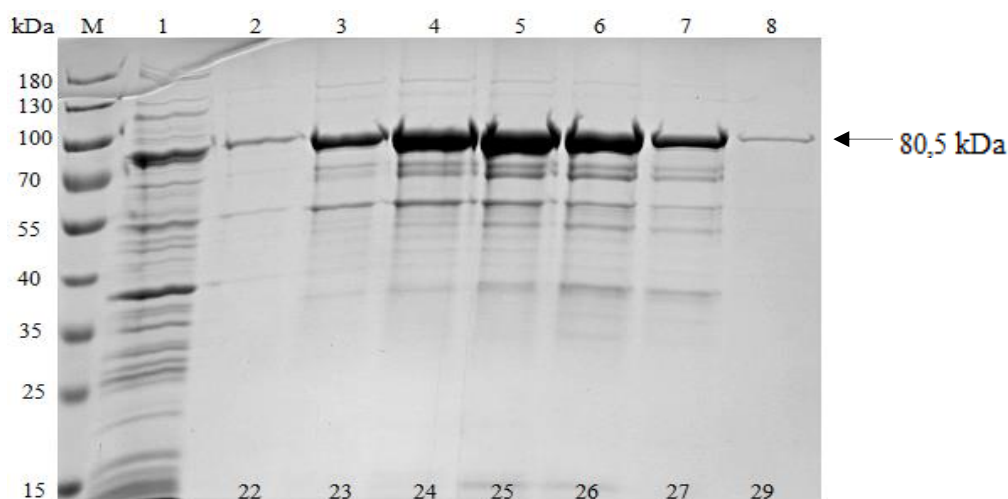
Na obrázkoch 16, 17 a 18 sú vyobrazené 12% akrylamidové gély s elučnými frakciami pre overenie správnej veľkosti, dostatočnej koncentrácie proteínu a absencie degradácie. S frakciami v skúmavkách, ktoré mali na gély najhrubšie prúžky (najviac koncentrované frakcie) bola vykonaná dialýza.



Obr. 16: Overenie vypurifikovaného proteínu TbRISP. Číslo 1 označuje prefiltrovaný bunecný lyzát pred purifikáciou a čísla vzoriek 2-9 označujú jednotlivé elučné frakcie vypurifikovaného proteínu. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific). S frakciami 41, 42, 43, 44, s najväčšou koncentráciou proteínu, bola vykonaná dialýza.



Obr. 17: Overenie vypurifikovaného proteínu TbCOXIV. Číslo 1 označuje pelet po solubilizácii, číslo 2 prefiltrovaný bunecný lyzát a čísla vzoriek 3-9 označujú jednotlivé elučné frakcie vypurifikovaného proteínu. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific). S frakciami 25, 26, 27, 28, 29, s najväčšou koncentráciou proteínu, bola vykonaná dialýza.



Obr. 18: Overenie vypurifikovaného proteínu TbNDUFA6. Číslo 1 označuje prefiltrovaný bunecný lyzát pred purifikáciou, čísla vzoriek 2-8 označujú jednotlivé elučné frakcie vypurifikovaného proteínu. Písmeno M označuje proteínový marker (Unstained protein ladder) (Thermo Scientific). S frakciami 23, 24, 25, 26, 27, s najväčšou koncentráciou proteínu, bola vykonaná dialýza.

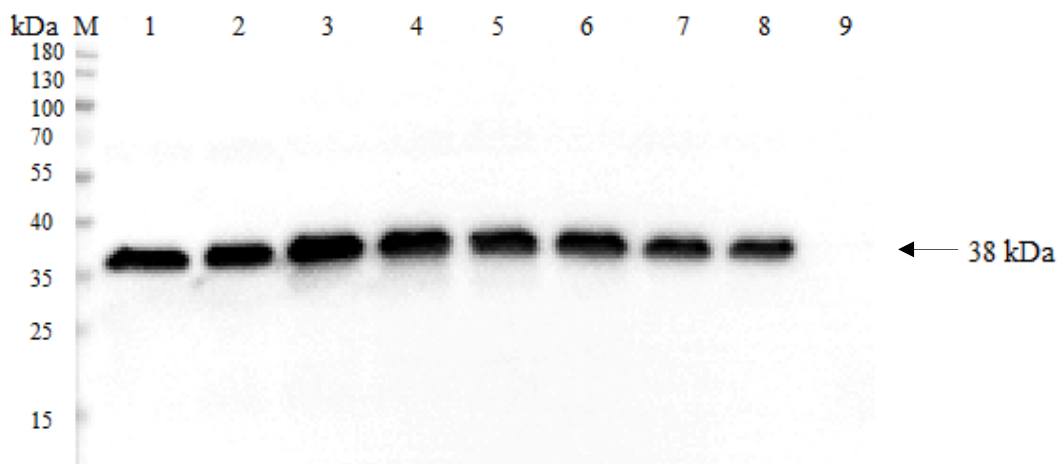
4.5 Určenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou

Pre určenie výslednej koncentrácie proteínov po dialýze bola použitá Bradfordova metóda, ktorá využíva posun absorpčného maxima Coomassie blue po väzbe na proteín. Použitím kalibračnej krivky o známej koncentrácie proteínu bolo možné určiť skutočnú koncentráciu nášho skúmaného proteínu. Rovnicou lineárnej regresie bol pre každý proteín vypočítaný koeficient determinácie (R^2) s hodnotami 0,9905 pre TbRISP, 0,9903 pre TbCOXIV a 0,9912 pre TbNDUFA6. Výsledná koncentrácia proteínov bola 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pre TbRISP, 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pre TbCOXIV a 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pre TbNDUFA6. Následne boli proteíny odoslané na imunizáciu králikov za účelom tvorby protilátok do Davids Biotechnologie GmbH v Nemecku.

4.6 Western blotting

Po úspešnej imunizácii králikov boli protilátky proti našim proteínom testované pomocou Western blotu s použitím sekundárnej anti králičej protilátky s konjugovaným reportérovým enzýmom HRP s následnou vizualizáciou pomocou ECL substrátu. Vo všetkých prípadoch afinitnej purifikácie došlo k ich špecifickému viazaniu na membránu (obr. 19; obr. 20; obr. 22). U protilátky TbNDUFA6 sme testovali aj jej krvné sérum, ktoré sa na membránu viazalo na viacerých miestach nešpecificky (obr. 21). Až po afinitnej purifikácii sa proteín

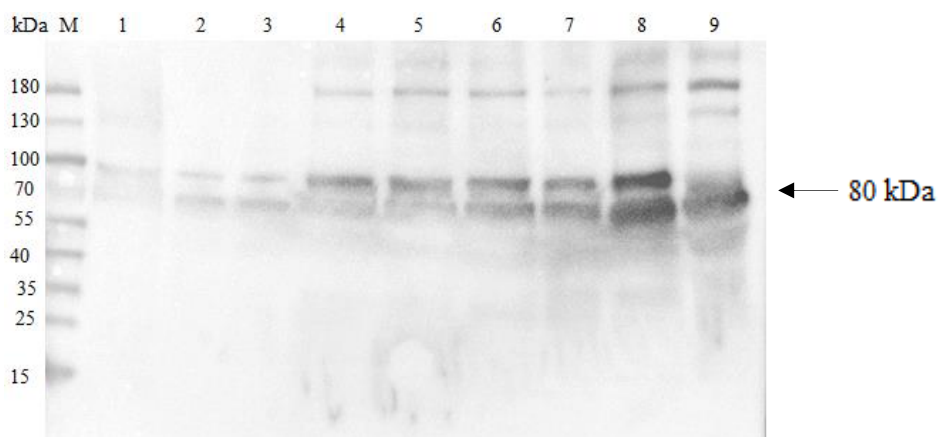
viazal na membránu špecificky, čo je na géli vyobrazené ako rovnako silný signál v mieste odpovedajúcej veľkosti TbNDUFA6 proteínu (obr. 22).



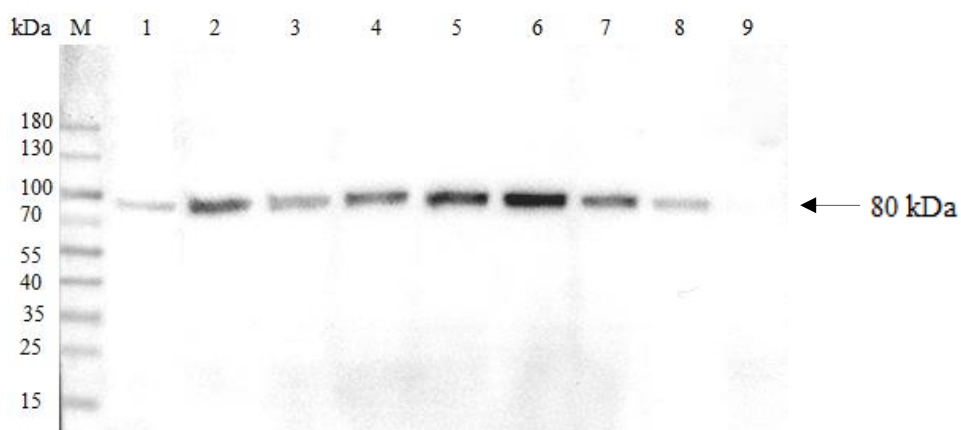
Obr. 19: Overenie protilátky proteínu TbRISP. Čísla 1-8 označujú bunečné lyzáty pripravené z rôznych línií procyklických foriem *T. brucei*. Číslo 9 označuje lyzát z krvnej formy *T. brucei*, u ktorého nebola pozorovaná prítomnosť proteínu TbRISP. Písmeno M označuje proteínový marker (Prestained protein ladder) (Thermo Scientific).



Obr. 20: Overenie protilátky proteínu TbCOXIV. Čísla 1-8 označujú bunečné lyzáty pripravené z rôznych línií procyklických foriem *T. brucei*. Číslo 9 označuje lyzát z krvnej formy *T. brucei*, u ktorého nebola detekovaná prítomnosť proteínu TbCOXIV. Písmeno M označuje proteínový marker (Prestained protein ladder) (Thermo Scientific).



Obr. 21: Overenie protilátky v krvnom sére proteínu TbNDUFA6. Čísla 1-8 označujú bunečné lyzáty pripravené z rôznych línií procyklických foriem *T. brucei*. Číslo 9 označuje lyzát z krvnej formy *T. brucei*, u ktorého nebola pozorovaná prítomnosť proteínu TbNDUFA6. Písmeno M označuje proteínový marker (Prestained protein ladder) (Thermo Scientific).



Obr. 22: Overenie protilátky proteínu TbNDUFA6. Čísla 1-8 označujú bunečné lyzáty pripravené z rôznych línií procyklických foriem *T. brucei*. Číslo 9 označuje lyzát z krvnej formy *T. brucei*, u ktorého nebola pozorovaná prítomnosť proteínu TbNDUFA6. Písmeno M označuje proteínový marker (Prestained protein ladder) (Thermo Scientific).

5 Diskusia a záver

V mojej bakalárskej práci som sa zamerala na mitochondriálne membránové proteíny *T. brucei* s cieľom získať príslušné protilátky. Celkovo sa jednalo o tri proteíny zodpovedné za elektrónový transport, a to: TbRISP, lokalizovaný v komplexe III (bc₁, ubichinol-cytochróm c-reduktáza) na vnútornej mitochondriálnej membráne, typický svojim obsahom zložiek železa a síry, TbCOXIV, lokalizovaný v komplexe IV (cytochróm c-oxidáza), ktorý predstavuje najväčšiu podjednotku tohto komplexu, tiež s výskytom na vnútornej mitochondriálnej membráne a proteín TbNDUFA6, nachádzajúci sa v komplexe I (NADH-ubichinónreduktáza), najväčšieho z komplexov mitochondriálneho respiračného reťazca u *T. brucei*.

Ako prvá bola potrebná amplifikácia určitých úsekov DNA génov *TbRISP* (Tb927.9.14160) a *TbCOXIV* (Tb927.1.4100) s použitím Taq-Purple DNA polymerázy a KOD Hot Start DNA polymerázy. S KOD Hot Start DNA polymerázou sme následne ďalej pokračovali nie z dôvodu väčšej rýchlosti než u Taq-Purple DNA polymerázy, ale kvôli exonukleázovej aktivite, čím sme si mohli byť istí minimálnymi nepresnosťami pri replikácii DNA. Po prečistení fragmentov amplifikovaných úsekov DNA došlo k ligácii do plazmidov pGEM[®] - T easy a pSKB3, s transformáciou plazmidových vektorov do *E. coli* XL1-Blue s cieľom získať príslušnú plazmidovú DNA. K overeniu prítomnosti inzertu v plazmide bola vykonaná restrikcia tejto plazmidovej DNA s príslušnými restrikčnými enzýmami (viz. tab. VI; tab. VII). Sangerovou sekvenáciou boli overené všetky plazmidy so zaligovanými fragmentami. Expresia nami vytvorených rekombinantných proteínov prebiehala v expresných bunkách C41, kde sme zámerne indukovali expresiu proteínov pomocou činidla IPTG – spúšťača lac operónovej aktivity, a taktiež bola testovaná rozpustnosť proteínov. Overenie indukcie bolo možné použitím SDS-PAGE elektroforézy s následným ofarbením gélu Coomassie blue. V prípade TbNDUFA6 sa stalo, že indukcia proteínu nebola na takto ofarbenom géli dobre viditeľná. Preto bola zvolená senzitivnejšia metóda detekcie rekombinantného tagovaného proteínu, a to western blotting s následnou vizualizáciou študovaného proteínu pomocou špecifickej His protilátky. Western blotom bola preukázaná expresia TbNDUFA6 v baktériách. Všetky proteíny boli vypurifikované afinitnou kvapalinovou chromatografiou HPLC s následným prečistením od zvyšných nežiadúcich látok pomocou dialýzy s následným určením koncentrácie Bradfordovou metódou. Takto pripravené proteíny boli odoslané na imunizáciu králikov s cieľom získať polyklonálne protilátky, ktoré boli otestované pomocou Western blotu.

Membránové proteíny sú často silno hydrofóbne, a preto nebývajú exprimované baktériami do cytozolu, ale ukladajú sa vo forme nerozpustných inklúzných teliesok. Tvorba inklúzií môže byť ďalej podmienená viacerými faktormi. Buď sú proteíny produkované vo veľkom množstve a nesprávne sa zbalia do príslušnej konformácie, alebo prítomnosť cysteínu v proteíne spôsobí zosilnenie tendencie k tvorbe agregátov (Jungbauer & Kaar, 2007).

Z tohto dôvodu sme museli použiť počas purifikácie sarkosyl, aby nám inklúzne telieska rozpustil. Všetky výsledky mojej práce boli úspešné, keďže protilátky proteínov TbRISP, TbCOXIV a TbNDUFA6 sa viazali vo Western blote špecificky na membránu (obr. 19; obr. 20; obr. 22). Taktiež na membránach z Western blotu vidieť, že pod číslom 9 (vzorka obsahujúca krvnú formu *T. brucei*) nevidno žiaden signál, čím sa nám potvrdila absencia komplexov III a IV, v ktorých sa tieto proteíny vyskytujú (obr. 19; obr. 20; obr. 21; obr. 22).

S takto vyrobenými protilátkami bude do budúca testovaný mitochondriálny elektrónový transportný reťazec procyklickej formy *T. brucei*, konkrétne diferencujúce sa bunky s následným monitoringom abundancie daných podjednotiek, a tým aj celých komplexov vďaka tejto čiastkovej informácii spoločne s ďalšími podjednotkami.

6 Zoznam použitej literatúry

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K. & Walter P. Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie: 2. vydání (2005) *Espero publishing*, Ústí nad Labem, str. 410-413.

Bakker, B. M., Michels, P. A. M., Opperdoes F. R. & Westerhoff, H. V., (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3207-3215.

Bateta, R., Wang, J. W., Wu, Y. N., Weiss, B. L., Warren, W. C., Murrila, G. A., Aksoy, S. & Mireji, P. O., (2017) Tsetse fly (*Glossina pallidipes*) midgut responses to *Trypanosoma brucei* challenge. *Parasites & Vectors* **10**: 614.

Clarkson, Jr. A. B., Bienen, E. J., Pollakis, G. & Grady, R. W., (1989) Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *The Journal of biological chemistry* **264**: 17770-17776.

Czichos, J., Nonnengaesser, C. & Overath, P., (1986) *Trypanosoma brucei* – cis-Aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of blood-stream to procyclic trypomastigotes invitro. *Experimental Parasitology* **62**: 283-291.

Devenish, R. J., Prescott, M. & Rodgers, A. J. W., (2008) The structure and function of mitochondrial FoF1-ATP synthases. *International review of cell and molecular biology* **267(08)**: 1–58.

Fenn, K. & Matthews, K. R., (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 539-546.

Gnipova, A., Subrtova, K., Panicucci, B., Horvath, A., Lukes, J. & Zikova, A., (2015) The ADP/ATP Carrier and Its Relationship to Oxidative Phosphorylation in Ancestral Protist *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* **14**: 297-310.

Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A., (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease* **2**: 11.

Herman, M., Perez-Mora, D., Schtickzelle, N. & Michels, P. A. M., (2008) Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* **4**: 294-308.

- Hines, J. C. & Ray, D. S., (2011) A Second Mitochondrial DNA Primase Is Essential for Cell Growth and Kinetoplast Minicircle DNA Replication in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell* **10**: 445-454.
- Chaudhuri, M., Ott, R. D. & Hill, G. C., (2006) Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology* **22**: 484-491.
- Isaac, C., Ohiolei, J. A., Ebhodaghe, F., Igbinosa, I. B. & Eze, A. A., (2017) Animal African Trypanosomiasis in Nigeria: A long way from elimination/eradication. *Acta Tropica* **176**: 323-331.
- Jungbauer, A. & Kaar, W., (2007) Current status of technical protein refolding. *Journal of Biotechnology* **128**: 587-596.
- Kennedy, P. G. E., (2013) Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet neural* **12**: 186-194.
- Kolev, N. G., Ramey-Butler, K., Cross, G. A., Ullu, E. & Tschudi, C., (2012) Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. *Science* **338(6112)**: 1352-3.
- Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., Coombs, G. H., Barrett, M. P. & Bringaud, F., (2005) Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 11902-11910.
- Lejon, V., Boelaert, M., Jannin, J., Moore, A. & Buscher, P., (2003) The challenge of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness diagnosis outside Africa. *Lancet infectious diseases* **3**: 804-808.
- Lukeš, J., Hashimi, H., Verner, Z. & Cicova, Z., (2010) The Remarkable Mitochondrion of Trypanosomes and Related Flagellates. *Structures and organelles in pathogenic protists* **17**: 227-252.
- Matthews, K. R., (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* **118**: 283-290.
- Matthews, K. R., Ellis, J. R. & Paterou, A., (2004) Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in Parasitology* **20**: 40-47.

- Mitchell, P., (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-8.
- Molina Portela, M. D., Lugli, E. B., Recio-Pinto, E. & Raper, J., (2003) Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **144**: 218-226.
- Nolan, D. P. & Voorheis, H. P., (1992) The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the FoF1-ATPase. *European Journal of Biochemistry* **209**: 207-216.
- Oli, M. W., Cotlin, L. F., Shiflett, A. M. & Hajduk, S. L., (2006) Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. *Eucaryotic Cell* **5**: 132-139.
- Opperdoes, F. R., Borst, P., Bakker, S. & Leene, W., (1977) Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **76**: 29-39.
- Panicucci, B., Gahura, O. & Zikova, A., (2017) *Trypanosoma brucei* TbIF1 inhibits the essential F₁-ATPase in the infectious form of the parasite. *Plos neglected tropical diseases* **11**: (4), e0005552.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G. D., Steinberg, A. G. & Stuart, K., (2005) The F₁-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO J* **24(23)**: 4029-4040.
- 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), 29.
- Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P. & Figueiredo L. M., (2017) Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle [version. *FL1000Research* **6**: 683.
- Smith, T. K. & Butikofer, P., (2010) Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **172**: 66-79.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S. & Tarleton, R., (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* **118**: 1301-1310.

Verner, Z., Basu, S., Benz, C., Dixit, C., Dobakova, E., Faktorova, D., Hashimi, H., Horakova, E., Huang, Z. Q., Paris, Z., Pena-Diaz, P., Ridlon, L., Tyc, J., Wildridge, D., Zikova, A. & Lukes, J., (2015) Malleable Mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *International Review of Cell and Molecular Biology* **315**: 73-151.

Visser, N. & Opperdoes, F. R., (1980) Glycolysis in *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* **103**: 623-632.

Zubay, G. L., Parson, W. W. & Vance, D. E. Principles of Biochemistry. Volume 1 (1995) Wm. C. Brown Publishers, The United States of America, str. 282-286, 306-324.

7 Prílohy

Sekvencia génu *TbRISP*. Sekvencie syntetických oligonukleotidov použitých pre amplifikáciu génu sú podčiarknuté. Forward primer obsahuje restričné miesto pre BamHI endonukleázu a reverse primer pre XhoI endonukleázu.

ATGTTCCGCAGGTCCTGCATATCAGCTTTCCAACCCACGGCATTTCCTTCGCGTATCGCTGGTCTTTAAGCAACT
TGAAGGTTCCAACCCATTAACTGTAAAGGACAGACCCGTGAATTCATGGTCCGACGAATTTCTAAAACAC
CCGTATCGAAGGAGATGGCAGACAAGTACGGCCGATACGCCAAATACTCCGACCCAACGTTGTGTTCAAGTGG
ATACCTCTTCTGAGGTTGTTCTCAACACATATCCGGAGGGATCTCGTGAGGGACGCATTGAGGCCACAGCCG
GCGTCGCTCTCAAGGATTACGACGCTTCCATGTGGGACGAGGAGTTTTTCCGCAAGTACATATTGAAACCGA
AGTTGCCTAATGAATTAGAGGACCGTGC GCGCTCACAGACTATGCGCTGAATTCTGCATTGTTGGGATTTGT
TATTCTTATGGTGC GGATGCCGTGTTGCCGCTGTGGTACGTTGGACAGCCGGCCATGTCCATGGTTGGTCAA
ATGAACATTGAGGCTGAGGTGGGTGAGCTAGAGGACCGTGAATGCAAGACTGTAGTATGGCGGGGCAAACC
CGTGTGTTGTTTATCGCCGCTCAGAGCGCAAATGAATGATGTGCTGGGGACTCCACTCAGTGC ACTGAAGCAT
CCCGAAACGGACGAGGCCCGCTTCCCTGACCATCGTGAAATGGCTGTTGTCATCGCTATTTGCACTCATCTCG
GGTGCATTCCCATTCTAACGAGGGTCTCTTTGGTGGCTTCTTCTGTCCGTGTCACGGCAGTCATTACGACGCT
TCAGGTCGTATTCGTCAAGTCCCGCCCTCTTAACTTGGAGGTACCGCCGTACCGCTGGGTGGATGATAAGA
CGATATATTTGGGAAAACTATAG

Sekvencia génu *TbCOXIV*. Sekvencie syntetických oligonukleotidov použitých pre amplifikáciu génu sú podčiarknuté. Forward primer obsahuje restričné miesto pre BamHI endonukleázu a reverse primer pre HindIII endonukleázu.

ATGTTTGTCTCGCCGCTCACTCATAGCGACTGTTGCAGCCGCTACCGCCACCAAACCCACGTCCTCAGCTGCTC
AATCAAATGCTAATGGAAGTCTGCCACGCAATCCACATTACTTCAGCAGCGCCGCTATGATCACGACCGCT
GGTATGGTACGCCCTCGAGCTTGACAGTCACAATTACAAATTTACCGGTGAGCCGCCAGTTGGATGCGGG
TCCGCGAGCGCACTGAAGAGGAGACAAATTTGCCAAATCGGTA CTCCACACGTGGATTTCGCCAGCAGTT
ATGAATGCCTTCTGTTTATGTCGGACCGCCTGAACGGGACGTTAAACCGCAAAGAGTTTGGTAACGAGGTGC
GTTTCCGGTTGGAGAAGCAATCCAACACGGTGGCCCGCGCTCAACAGCTGCTGAAGGACGGACGTGCTGGAG
GCGATGAGCGTGTGAGAATGCCATGATTGCTCGCATATTCGATGAGGAGCACGTGCAGGCTGAGATGCGCT
ATGTGAAGTGCATTTCGCGCAACGAACCTGCAGAGGATAATCGACTGGATATTCTTCCCGCGGTTTCGCCCA
ATTCCCTGCGCGAGAAGACACGGTGGAAATGTAAACACGGAACCTGCACCCAGCCGACCGTGCAGAGATCGCGT
CTCGTCTCACGGCGTGGCTTCCAGAGAAGTATCATATCGTTTATGTGGATGATTTTCAGACGGTGGCTGCGAA
TGACAGCTGCGCGCTGACGCTATGTTGCGTATTGTTGAGGGTGTGTCGAAGGAATATGAAACGGAGGCCCG
TTCCAGCGGTTACGAGCGAGATCTACGGGAGGTGGTGCAGGAGCTGTTGGATGATGTGGACCCGTCACGACA
CATCACTTCAGAGGCAATTAAGCAGCAACAGACTTGACTCAGTTGGAGGAATGGTCGCGGGTGGTGCATGA
ATATAATGGTGTGAGCGTATCCTCGACATTTACAGCCGTGCTGCTGAGCTTACGCGTAATGAGGAACACAA
GAAACTTGTGGAGGATATGAGGCAATGGAAGAAGCTCTCAAACAAGATTTAG

Sekvencia génu *TbNDUFA6*. Sekvencie syntetických oligonukleotidov použitých pre amplifikáciu génu sú podčiarknuté. Forward primer obsahuje restričné miesto pre BglII endonukleázu a reverse primer pre XhoI endonukleázu.

ATGCTTCGTCGAGCATGCCTTGCTGGTAGGGTGAGCGCCATCGCTACCCCTGGGTTTGCTACTTGTAATAAC
TTTCAAGTGTTCCTCCAGTGGGAACGACAAGAAAAACACTAAGGCTGGACTGCTGTCTGGAAGTGAAGTG
AAGGACATCATACTGGTCTATTCTTGGCGCCACTGGGAAGGATAATCGACAGGGGATATATTCTACAAGGG
GTTCACCTTCCTATTTTGAGAAAACGCTATCCCCGAAAAAGGGCGAGTTGGTGAGTAAGCAGGTTGTGGAT
CCAAATGAGCCAAGAGATCGCTCTGATAATTTGAAGGCTCCTGAGTTTGATACTTCGTTAGGCAAGTTTGAGC
AAGCACCATACTTTACTGGAGGACCTGGTGCCATGAGGTACAATAACTATGTGCGGGAACCGGTGGATAAAG
AAGGTGTAGATTATCGTGATGTTGTTCCACTTCCGCCATTTGAGGACCATCACCCAGATTTCTCGTACGCATC
AGCGACAGGAAAGCGCGAGGGGGACATTACCCTTTTAGCAAACACTGTCGTAAACTGGGAGATAAAGGCCG
CTATGATGTCTCTATCGCTCTTGCCTTAAGGGGCTTCCAATGGTTAAACACTACTACTGGTTGCTTACGCCA
CTGCCAGAGATGAAATCGAAGATACGAGAGCGTTTCCTTCAAATCAGCACACGAAAGATCCTGATGCTATT
AGACATTTGTTACATAATGGATGGATGGAATACCAGGAGGTTATTTGTTTAGGCGAACACGGGCATCGGTT
GCCAAATTTTTGAATGGGAAAGCCAAGACGAACCTTGTGCGTGGCTACACACGGGAGGAGGGGAAGATGCA
AGAGGAACGCGCCTTCTGGAACGGAGAGGAACAACGAAGGGAGGGCCCATATGATGGACATTGGTCTTGGC
TCGGAAAGGAGAGCGAAAAGGAGTTCGCTAAGATTGCAGGTAGGATTTCCATTTTCGTGGTTCGACGTCGAAAG
GCTACTTTGAAAAAGGACAAGCTGATGGCACCAATTATTGGGAGAAAAACCTGGATTACGAAGTTGGTATA
TTAAAAATGTGGACCCTGATCGCCAGAACGCAAGGCGTGAAATGCAGGGTTGGATTGAAAGCGGGTATAACC
AACCGAAACATTATGCTAGCAAAAAACAGACGTGGGTATCGTAGACTTGTTAAGGACATTGAAACTATGATGG
AACTTCGATGGAGGATTTATATACAAAGAACAGAGAACAGCTGTTCCAATACCTTATTAGGGAACACATC
CGGAATCAAATCGTATTAACGCGGAACGTGTTCTTTCGAGACAAGACGATGACTTTTACTCTACGAGGTTTGA
TGAGTACGAGAAATACCTGAAGCAGGCAATGCGTGAGATGCCCAACCCGCGCTTATGGAAGACTGATGCTTT
TTACTTTTCGATTACGGTACCTGCTTGGCTCCCTCGAATACAACCTGGGCAAAGGTTCCATTGGTATATCGCAG
GAGAAGTTGTACAACGAATGGATTTCTGACAACGCCAACTACGCAATTTTAAACAGTGCAACGTTTTCAAAT
ATAAAGAACAATAAACTAAAAAATCCAATGGCCAGAACCTGGGCCGATTTTACAACGACTACGATCCAGAT
GTCCCGGAGACGCGGAGACTTCCTTGGTATCATCCGATTTTGACTATGATCGCCGGCACAATGGGATGAA
AGGTGCATGCGAATGAAGCGGTGGGTTTCAGGGGGAACTATTGACGGCAAGCTGCCATACTTCGACAGTATC
ATAGCCGAGTGGGAACAATATGTCAATCGTCCTGAGCGATTTTCGAGCCTCGGATAGTGCTGAGCGTCCGTAT
GCCGCCCAAGAATGGTTCAGCTCTATCGGTCGTTGAACCGGTTAATGGATGTTGCCTTAGTAAATCAAATGA
GGGCTGTTGTGGAGAGTAGTCTCTTAAATACTCAAGTGGAGCTATCACGTGCCTCTGTTACGGACATCCAAAG
GATGTTAATATCCGTGGATTTACGGACTTTTCGATTTCGTGGTTCCAATATCATATACCCAGATGGGGTCCAG
CAGCCGGTGGTAGGATTAGACGGAAATGTGGTTGCTCGCAGATTTAG