

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Tereza Zemanová

**Charakterizace unikátních proteinů *Giardia intestinalis* a
jejich úloha v biogenezi mitosomů**

Characterization of unique proteins of *Giardia intestinalis* and
their role in mitosomal biogenesis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.4.2019

.....

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému skvělému školiteli Pavlu Doležalovi za trpělivé vedení, cenné rady a pozitivní přístup k věci. Kolegům Vladěce a Lubošovi děkuji za nezměrnou trpělivost a ochotu předat mi své znalosti, Bětce za všechnu pomoc a zásobování laborky dobrou náladou, bez které si ty roky v BIOCEVu ani neumím představit, a samozřejmě zbytku MaTeLu za jejich neocenitelnou podporu. Veškerému dalšímu osazenstvu naší laboratoře a parazitologického křídla v BIOCEVu děkuji za ochotnou pomoc kdykoliv a s čímkoliv. Děkuji laborantkám Evičce a Míše za umožnění hladkého průběhu práce v laboratoři. Obrovský dík patří mé rodině a přátelům za to, že mi byli tolik potřebnou oporou.

Abstrakt

Jednobuněčný parazit *Giardia intestinalis* je jedním z organismů nesoucích mitochondriím příbuznou organelu označovanou jako mitosom, přizpůsobenou mikroaerobnímu stylu života. Jedinou doposud známou funkcí mitosomů tohoto prvoka je syntéza železosírných center. Studium mitosomálního proteomu vede k získávání informací o biogenezi a funkci této neobvyklé organely. K rozšiřování znalostí o mitosomech jsou v posledních letech hojně využívány analýzy interaktomů známých mitosomálních proteinů. Moderní metodou je využití chemického crosslinku a následné imunoafinitní izolace komplexů obsahujících studovaný protein.

V této práci byly bioinformatickými nástroji blíže charakterizovány proteiny potenciálních interaktomů proteinů *GiTom40* a *GiMOMP35*. U čtyř vybraných proteinů byla pomocí fluorescenční mikroskopie určena buněčná lokalizace. Vybraný protein predikovaný jako střední řetězec dyneinu DIC6939 byl fylogeneticky zařazen mezi axonemální dyneiny. Superrezoluční mikroskopií byla zkoumána jeho kolokalizace s mitosomy a pomocí modré nativní elektroforézy byly vizualizovány nativní komplexy obsahující DIC6939. V rámci této práce se podařila také optimalizace podmínek nutných pro izolaci interaktomu DIC6939. Výsledkem této práce je první experimentální charakterizace středního řetězce dyneinu v *G. intestinalis*.

Abstract

The unicellular parasite *Giardia intestinalis* is one of the organisms carrying mitochondrion-related organelle known as mitosome, which is adapted to the microaerobic lifestyle. The only known function of the mitosome is the synthesis of the iron-sulphur clusters. The research of the mitosomal proteome provides new information on the biogenesis and function of this unusual organelle. One of the means of the mitosome research is the analysis of the interactome of the known mitosomal proteins. The state-of-the-art method of the interactome approach is the use of the chemical crosslinking and the subsequent immunoaffinity isolation of the complexes, containing the protein of interest.

In this thesis, the interactomes of *GiTom40* and *GiMOMP35* were characterized with the bioinformatic tools. The cellular localization of four of the chosen proteins was determined by the fluorescent microscopy. One of the proteins, the predicted dynein intermediate chain DIC6939, was phylogenetically classified as an axonemal dynein. The superresolution microscopy was utilized to observe the possible colocalization of DIC6939 with the mitosomes and blue native PAGE led to the visualization of its native complexes. In this work, the optimal conditions for DIC6939 interactome isolation were successfully determined. The outcome of this thesis is the first ever experimental characterization of the *G. intestinalis* dynein intermediate chain.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 <i>Giardia intestinalis</i>	2
2.1.1 Organizace buňky.....	2
2.1.2 <i>Giardia intestinalis</i> objektem vědy	4
2.1.3 Mitosomy	5
2.1.3.1 Charakteristika mitosomů	5
2.1.3.2 Funkce mitosomů	6
2.1.3.3 Mitosomální proteom a jeho studium.....	8
2.1.3.4 Transport proteinů přes mitosomální membrány	11
2.1.3.5 Interakce mitosomu s ostatními organelami.....	13
2.2 Dynein.....	14
2.2.1 Mitochondriální transport zprostředkovaný dyneinovými motory.....	15
3 Cíle práce	17
4 Materiál a metodika	18
4.1 Organismy a jejich kultivace.....	18
4.1.1 <i>Escherichia coli</i>	18
4.1.2 <i>Giardia intestinalis</i>	18
4.2 Bioinformatické nástroje.....	18
4.3 Plazmidy.....	19
4.4 Konstrukty.....	20
4.5 Amplifikace genů	20
4.6 Izolace a klonování DNA fragmentů.....	22
4.7 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	23
4.8 Transfekce buněk <i>G. intestinalis</i>	23
4.9 SDS-PAGE.....	24
4.10 Western blot.....	24
4.10.1 Použité protilátky	25
4.11 Příprava preparátů pro mikroskopii	25
4.11.1 Fixace buněk metanolem/acetone	25
4.11.2 Fluorescenční značení preparátů fixovaných metanolem/acetone	25
4.11.3 Paraformaldehydová fixace buněk	26
4.11.4 Fluorescenční značení preparátů fixovaných paraformaldehydem	26
4.11.5 Protilátky použité na preparátech.....	26
4.12 Frakcionace trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	27
4.13 Laboratorní determinace topologie proteinu	27
4.13.1 Analýza odolnosti vůči trypsinu.....	27
4.13.2 Extrakce uhličitanem sodným	28
4.14 Analýza interagujících proteinů	28
4.14.1 Testování optimální koncentrace crosslinkeru	28

4.14.2	Chemický crosslinking.....	29
4.14.3	Izolace pomocí Dynabeads.....	29
4.14.4	Izolace proteinu bez chemického crosslinkeru.....	30
4.14.5	Izolace proteinu s použitím redukčního činidla	30
4.14.5.1	Analýza mobility v SDS-PAGE	31
4.14.6	Modrá nativní elektroforéza	32
5	Výsledky	33
5.1	Bioinformatická analýza interaktomu proteinů vnější mitosomální membrány	33
5.2	Příprava plasmidů pro expresi v <i>G. intestinalis</i>	35
5.3	Dvojitá transfekce <i>G. intestinalis</i> a ověření exprese	36
5.3.1	Protein GL50803_91712.....	36
5.3.2	Protein GL50803_137685.....	37
5.3.3	Protein GL50803_96818.....	38
5.3.4	Protein GL50803_6939.....	39
5.3.5	Protein GL50803_31295.....	40
5.3.6	BirA.....	40
5.3.7	Výběr vhodného kandidáta pro další práci.....	41
5.4	Charakterizace DIC6939 <i>in silico</i>	41
5.5	Mikroskopická analýza buněčné lokalizace.....	48
5.6	Determinace topologie proteinu DIC6939	49
5.6.1	Analýza odolnosti vůči trypsinu.....	50
5.6.2	Extrakce uhličitánem sodným	50
5.7	Analýza interagujících proteinů	51
5.7.1	Testování optimální koncentrace crosslinkeru	51
5.7.2	Chemický crosslink a pulldown pomocí Dynabeads	52
5.7.3	Izolace DIC6939 bez chemického crosslinkeru	54
5.7.4	Izolace DIC6939 s redukčním činidlem.....	54
5.7.4.1	Analýza mobility DIC6939 v SDS-PAGE.....	57
5.7.5	Modrá nativní elektroforéza.....	58
6	Diskuse.....	59
6.1	Bioinformatická analýza a volba proteinů	59
6.2	Exprese proteinů a ověření lokalizace v buňce	60
6.3	Charakterizace proteinu DIC6939 <i>in silico</i>	62
6.4	Ověření kolokalizace DIC6939 a mitosomů	63
6.5	Izolace interaktomu DIC6939	64
6.6	DIC6939 v nativních komplexech	65
6.7	Shrnutí.....	66
7	Závěr	67
8	Seznam použitých zkratk.....	68
9	Literatura	69

1 Úvod

Buňka jednobuněčného parazita *Giardia intestinalis* vyniká řadou výjimečných struktur jako je přísavný disk, mediánní tělíska či zdvojený karyomastigont tvořený dvěma jádry a osmi bičíky. Jedním z center pozornosti jsou bezpochyby mitosomy, redukované mitochondrie, uzpůsobené mikroaerobnímu způsobu života jejich nositele. Redukce mitosomů vedla ke ztrátě jak typických struktur – krist, tak mitochondriálních funkcí, z nichž nejvýraznější je bezpochyby produkce ATP. Jedinou známou funkcí mitosomů *G. intestinalis* je tak tvorba železosírných center.

Studium mitosomálního proteomu je od počátku komplikováno výraznou evoluční divergencí proteinů tohoto parazita. Zpočátku byly mitosomální proteiny identifikovány pomocí bioinformatických nástrojů vyhledávajících známé homology. Při experimentální práci byly využívány metody vedoucí k izolaci obohacených buněčných frakcí. Tímto způsobem byla objevena řada nových mitosomálních proteinů. Limitací těchto metod jsou však kontaminace dominantními buněčnými strukturami, zejména endoplasmatickým retikulem. Pokrokovou metodou je využití chemického crosslinkeru a následné imunoafinitní purifikace komplexů potenciálního interaktomu vybraného mitosomálního proteinu.

Právě tímto způsobem byly izolovány interaktomy proteinů vnější mitosomální membrány *GiTom40* a *GiMOMP35* v publikaci Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using *in vivo* enzymatic tagging (Martincová et al., 2015), které se staly vstupními daty pro tuto práci. Cílem této práce tak byla bližší bioinformatická charakterizace jejich potenciálních interakčních partnerů a následná experimentální analýza vybraných proteinů. Pro jeden vybraný protein pak bylo cílem provedení reciproké proteomické analýzy jeho interaktomu.

2 Literární přehled

2.1 *Giardia intestinalis*

Středem pozornosti mé práce je jednobuněčný eukaryotický parazit *Giardia intestinalis* (také označovaný jako *Giardia lamblia* nebo *Giardia duodenalis*) patřící do řádu Diplomonadida v říši Excavata (Brugerolle, 1975; Cavalier-Smith, 2002). Jde o bičíkatého prvoka žijícího v mikroaerobním prostředí tenkého střeva hostitele.

G. intestinalis má jednoduchý životní cyklus, při kterém dochází ke střídání stádia trofozoita, přichycujícího se na stěnu tenkého střeva hostitele, a tlustostěnné cysty, odolné vůči vlivům vnějšího prostředí a sloužící k přenosu do dalších hostitelů (Ankarklev et al., 2010). Těch má rod *Giardia* široké spektrum - od obojživelníků přes ptáky až po savce - a projevuje se u nich průjemovým onemocněním zvaným giardióza. *G. intestinalis* se hostitel nakazí požitím cyst, z nichž se procesem excystace v trávicím traktu hostitele uvolní hlavní patogenní agens - trofozoiti. Ti se množí podélným dělením v horní části tenkého střeva (především v duodenu a jejunu) a poté část z nich odchází do nižších partií trávicí soustavy, kde dochází k tvorbě cyst procesem encystace a jejich odchodu do vnějšího prostředí. Nákaza je ve většině případů asymptomatická. V případě symptomatické nákazy se objevují mastné, páchnoucí průjmy, nevolnost, zvracení a úbytek váhy. Příznaky obvykle v řádu týdnů samy odezní. Chronická giardióza může vést k rozvoji syndromu dráždivého tračníku (irritable bowel syndrome, IBS), alergií, unavového syndromu či artritidy (Hanevik et al., 2009). V rozvojových zemích může neléčená giardióza zejména u dětí způsobovat podvýživu, růstové poruchy a život ohrožující dehydrataci v důsledku dlouhodobých intenzivních průjmů (Ankarklev et al., 2010).

2.1.1 Organizace buňky

Trofozoit *G. intestinalis* o délce 12 až 15 μm a šířce 5 až 9 μm má typický kapkovitý tvar buňky s výrazným přísavným diskem na ventrální straně. *G. intestinalis* patří mezi diplomonády s diplozoickou stavbou buňky, disponují tedy dvěma sadami organel symetricky uspořádanými podle podélné osy. Na první pohled zaujmou dvě velká morfologicky podobná jádra, která navzdory očekávání nejsou identická co do obsahu genetické informace. Obvykle nese každé z jader odlišný počet různě velkých chromozomů, přičemž ani v rámci jednoho jádra se nedá mluvit o standardní diploidii, neboť počet chromozomů je nezdědka lichý a geny jsou často přítomny v jiném počtu kopií než v očekávaných dvou (Tůmová et al., 2007; Tůmová et al., 2016). Obě jádra jsou však transkripčně aktivní (Kabnick and Peattie, 1990).

Jádro asociované s bičíky a mikrotubuly tvoří v buňce strukturu zvanou karyomastigont. Bičíků, stejně jako bazálních tělísek mají giardie osm ve dvou symetrických sadách (tetradách) uspořádaných podle osy buňky. Všechny axonemy bičíků jsou sestaveny z mikrotubulů a mají obvyklou 9+2 strukturu. I bičíky se v tomto organismu liší jeden od druhého, neboť prochází takzvaným flagelárním vývojovým cyklem, trvajícím déle než jeden buněčný cyklus. S každým dělením buňky dochází ke zrání bičíků a změně jejich pozice v buňce, přičemž nejstarší

je kaudální pár bičíků, který se jako jediný dále netransformuje (Nohýnková et al., 2006). Mimo bazálních tělísek jsou výraznými prvky cytoskeletu také dvě příčně položená mediální tělíska ve tvaru kladívek. Spekuluje se o nich jako o předsyntetizovaných mikrotubulech později sloužících k sestavení dceřinných přísavných disků (což nebylo podloženo žádným výzkumem), ale také jako o možných organizačních centrech mikrotubulů (Meng et al., 1996) či o elementech podílejících se na vertikální flexi posteriorní části buňky (Piva and Benchimol, 2004). Nejvýraznější a zcela unikátní strukturou cytoskeletu je přísavný disk, který umožňuje buňkám parazita adherovat na střevní stěnu (Holberton, 1973). Mezi další cytoskeletární útvary patří funis a mikrotubulární struktury podpírající v cytoplasmě axonemy kaudálních bičíků.

Endomembránový systém giardie je v porovnání s typickou eukaryotickou buňkou velmi zjednodušený. Teorie zmiňují dva radikálně odlišné důvody tohoto zjednodušení. Prvním je údajné umístění giardií na bázi eukaryotického stromu a představa, že jde o primitivní, a tedy jednoduchý organismus (Cavalier-Smith, 1993). V rozporu s tímto názorem je aktuálně převažující představa, že *G. intestinalis* je ve skutečnosti organismus odštěpující se v době blízké ostatním eukaryotům, u kterého ale došlo k sekundární redukci díky adaptaci na parazitický a mikroaerobní způsob života (Lloyd and Harris, 2002). K analogickým změnám došlo i u dalších parazitických organismů napříč různými skupinami eukaryot.

Nejvýraznější organelou endomembránového systému je endoplasmatické retikulum (ER), které je u *G. intestinalis* rozprostřené po celé buňce. Okolo jader je tvořeno rozsáhlými cisternami, do zbytku buňky pak vystupuje jako rozvětvená kanálkovitá struktura (Soltys et al., 1996; Abodeely et al., 2009). Kromě funkcí obvyklých pro ER se pravděpodobně podílí také na procesech typicky lokalizovaných v Golgiho aparátu a lysosomech, organelách, které giardiím chybí (Abodeely et al., 2009; Zamponi et al., 2017).

Pod plasmatickou membránou na dorzální straně buňky lze pozorovat kulovité až tubulární váčky označované jako periferní vakuoly (PV), dříve považované za lysosomy. Stejně jako v lysosomech je zde kyselé prostředí (Lanfredi-Rangel et al., 1998). Vakuoly komunikují s povrchem buňky v místech invaginací cytoplasmatické membrány a přijímají endocytovaný materiál (Zumthor et al., 2016). Jejich funkce zřejmě spočívá v interakci s endocytovaným materiálem – třídění a denaturaci endocytovaných proteinů či neutralizaci zásaditých produktů slinivky, se kterými se *Giardia* setkává v duodenu hostitele. Tyto váčky také přímo interagují s ER (Abodeely et al., 2009; Zumthor et al., 2016).

Povrch *G. intestinalis* je hustě pokryt vrstvou variantních povrchových proteinů (VSP) zřejmě zajišťujících buňce ochranu díky jejich neštěpitelnosti střevními proteázami (Nash et al., 1991) a zároveň generujících antigenní variabilitu. Jsou kódovány širokým spektrem příbuzných genů (Adam et al., 2010 uvádí odhad 271 genů), v danou chvíli má však buňka na svém povrchu pouze jeden druh VSP. Jednotlivé druhy VSP se od sebe mohou lišit velikostí, přítomností motivů a schopností vyvolat imunitní odpověď (Adam et al., 2010). Jejich obměna je složitý proces, který i přes rozsáhlý výzkum doposud není přesně pochopen, zřejmě ale zahrnuje specifickou roli RNA interference (Prucca et al., 2008). Za významné vlivy pro spuštění antigenní obměny jsou považovány například enviromentální podmínky či imunitní odpověď hostitele (Gargantini et al., 2016).

Cysty *G. intestinalis* se svou stavbou od trofozoitů výrazně liší. Jedná se o oválné buňky obalené silnou cystovou stěnou, která se vytvoří během encystace trofozoita za pomoci tzv. encystačních váčků (ESV). Cysty obsahují dvě sady jader, zato postrádají bičíky a přísavný disk (Palm et al., 2005). Cysty však nebyly předmětem výzkumu této práce, proto zde nebude jejich struktura podrobně popisována.

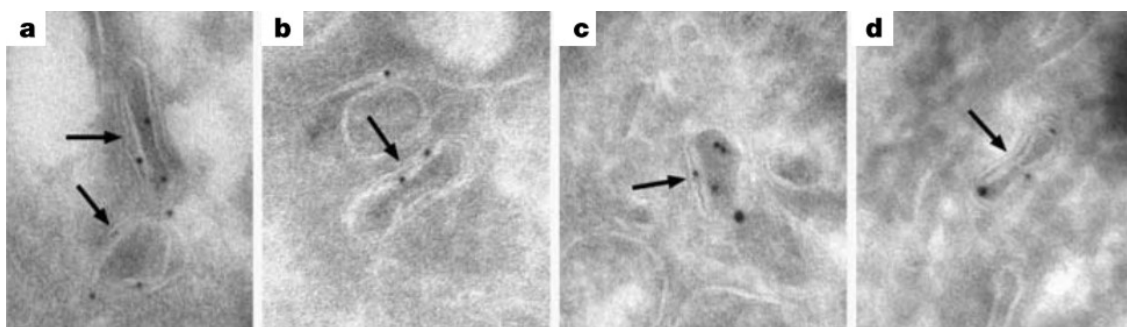
2.1.2 *Giardia intestinalis* objektem vědy

Kromě medicínského a veterinárního významu je *G. intestinalis* zkoumána i jako unikátní model pro studium vzniku a evoluce eukaryotické buňky. Dříve se zejména uvažovalo o jejím možném bazálním postavení v rámci eukaryotického stromu (Embley and Hirt, 1998). Tyto domněnky vycházely z původní představy, že *G. intestinalis* postrádá mitochondrie, peroxisomy i Golgiho aparát. K podpoře této hypotézy sloužily některé fylogenetické analýzy např. elongačního faktoru 1 alpha (Hashimoto et al., 1994) nebo malé podjednotky ribozomální RNA (Leipe et al., 1993). Bazální pozice ve vytvořených stromech však byla způsobena takzvaným efektem přitahování dlouhých větví (long branch attraction), který postihuje divergentní skupiny organismů (Embley and Hirt, 1998; Dacks et al., 2002). V současnosti je *G. intestinalis*, resp. rod *Giardia* řazen do říše Excavata, kmene Fornicata, do něž patří anaerobní či mikroaerobní bičíkatí prvoci s atypickými mitochondriemi (Simpson, 2003). Výzkum *G. intestinalis* se nyní zaměřuje na způsoby fungování zjednodušených metabolických drah či přítomnost unikátních buněčných organel (viz kapitola 2.1.3).

G. intestinalis je parazit poměrně nenáročný na laboratorní kultivaci. Kompletní životní cyklus lze reprodukovat *in vitro* s úplným vynecháním hostitelů. Práci vědcům usnadňuje také kompletně osekvenovaný genom několika asembláží (A1, A2 a B) (Morrison et al., 2007) a volně přístupná databáze GiardiaDB (<http://giardiadb.org>; Aurrecochea et al., 2009). K dispozici jsou nástroje pro částečnou genetickou manipulaci organismu, které umožňují expresi rekombinantních proteinů (Singer et al., 1998; Sun et al., 1998), RNA silencing (Dan et al., 2000; Rivero et al., 2010; Marcial-Quino et al., 2017) či dočasné částečné utlumení exprese pomocí morfolin (Carpenter and Cande, 2009). Relativně novými metodami jsou úplná inaktivace (knockout) genu za použití Cre/loxP systému (Wampfler et al., 2014) a utlumení genu pomocí metody CRISPRi, tedy interference modifikovaným systémem CRISPR/Cas9 (Qi et al., 2013; McNally et al., 2019). Velkou nevýhodou pro experimentální práci je přítomnost dvou aneuploidních jader (Tůmová et al., 2016) a nízká účinnost homologní rekombinace. To prakticky znemožňuje vytváření genetických mutantů, kteří by výrazně usnadnili charakterizaci velkého množství proteinů o neznámé funkci (Morrison et al., 2007).

2.1.3 Mitosomy

Ještě do nedávné doby byla *G. intestinalis* považována za primárně amitochondriálního prvoka (Hashimoto et al., 1998). Mezi první práce ukazující na možnou přítomnost mitochondrií patří článek o identifikaci homologu mitochondriálního chaperonu Hsp60 u *G. intestinalis*. K detekci proteinu byla použita protilátka proti lidskému Hsp60. Protilátka značila chaperon jak na western blotu, tak na preparátech, kde byla lokalizována v „přerušovaných váčkovitých strukturách“ v cytoplasmě (Soltys and Gupta, 1994). V další studii byla zjištěna sekvence genu pro Hsp60 a následná fylogenetická analýza tohoto chaperonu naznačila jeho příbuznost s mitochondriálními chaperony (Roger et al., 1998). V průběhu následujících let se objevilo několik dalších publikací odhalujících mitochondriální geny v genomu *G. intestinalis*. Vyvrcholením pátrání byla identifikace dvojitou membránou ohraničené mitochondrii-podobné organely – mitosomu – pomocí elektronové mikroskopie (viz Obr. 1) (Tovar et al., 2003).



Obrázek 1: Mitosomy zachycené pomocí elektronové mikroskopie. Kryorezy buňkou *G. intestinalis* jsou značeny metodou imunogold za použití protilátek anti-IscS (a) a anti-IscU (b) nebo obou (c,d), přičemž pro anti-IscU byly použity 8nm zlaté nanočástice a pro anti-IscS 12nm zlaté nanočástice. Šípky značí dvoumembránové struktury. Převzato a upraveno z Tovar et al., 2003.

2.1.3.1 Charakteristika mitosomů

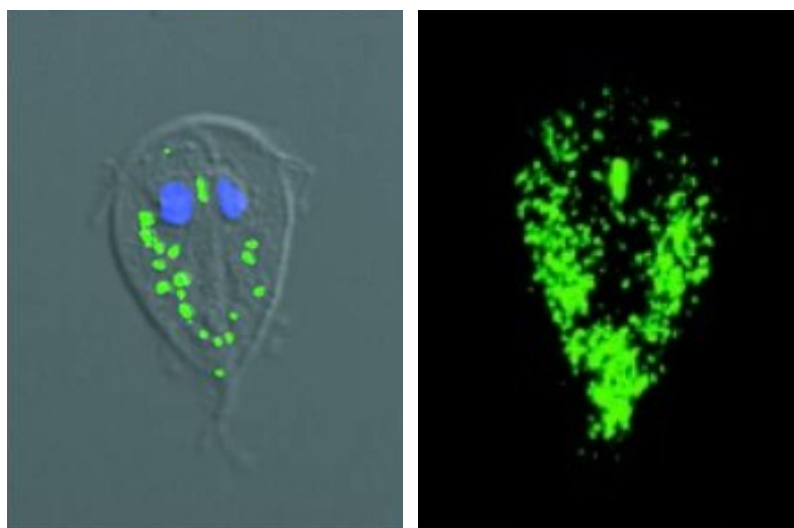
Mitosomy se řadí mezi tzv. mitochondrii-příbuzné organely (mitochondria-related organelles, MROs) a kromě giardií se nalézají i u dalších parazitických organismů – *Entamoeba histolytica* (Tovar et al., 1999), *Cryptosporidium parvum* (Putignani et al., 2004; Riordan et al., 2003) a mikrosporidií (Katinka et al., 2001; Williams et al., 2002).

Mitosomy jsou organely protaženého ovoidního tvaru, které jsou rozmístěné v cytosolu giardie. Podle umístění lze mitosomy rozdělit na dvě skupiny. První skupina se nachází mezi jádry v blízkosti bazálních tělísek bičíků a je označována jako centrální mitosomy (Regoes et al., 2005). Je dobře pozorovatelná na mikroskopických preparátech, neboť tvoří výraznou tyčinkovitou strukturu, která je v detailním zobrazení tvořena několika mitosomy. Druhá skupina je označovaná jako periferní mitosomy, pozorované v posteriorní a laterálních částech buňky (Regoes et al., 2005). Rozmístění mitosomů lze vidět na obrázku 2.

V *G. intestinalis* je obvykle pozorováno mezi 25 až 100 mitosomy (Tovar et al., 2003). Zatímco mitochondrie se dělí a fúzí během buněčného cyklu průběžně, u mitosomů takové chování pozorováno nebylo. V trofozoitech v interfázi se nachází stabilní počet mitosomů (Rout et al., 2016; Voleman et al., 2017). K dělení dochází pouze během mitózy před rozdělením

buňky či při encystaci. Cysta *G. intestinalis* má poté přibližně dvojnásobný počet mitosomů (Voleman et al., 2017).

Mitosom je ve srovnání s mitochondrií velmi malý, měří přibližně 140 x 60 nm (Tovar et al., 2003). Stejně jako mitochondrie je ohraničen dvěma membránami, vnitřní membrána mitosomu ale nevybíhá do krist. Centrální prostor ohraničený vnitřní membránou se nazývá matrix. Na rozdíl od mitochondrie mitosom neobsahuje vlastní genom. Veškeré jeho proteiny jsou kódovány v jádře a až posttranslačně transportovány dovnitř organely (Martincová et al., 2015).



Obrázek 2: Distribuce mitosomů v buňkách *G. intestinalis*. Levý snímek znázorňuje rozmístění mitosomů v jedné buňce giardie. Jde o spojení snímku zachyceného pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) s fluorescenčními kanály. Jádra jsou značena pomocí DAPI (modře) a mitosomy protilátkou proti hemaglutininovým tagem značenému proteinu IscU (zeleně). Na snímku lze zřetelně rozeznat centrální a periferní mitosomy (Převzato z Dolezal et al., 2005). Pravý snímek zachycuje superpozici mitosomů pětadvaceti buněk *G. intestinalis*. Jsou značeny pomocí protilátky proti proteinu GL50803_9296 (Převzato z Voleman et al., 2017).

2.1.3.2 Funkce mitosomů

Mitochondrie je organela esenciální pro naprostou většinu eukaryotických buněk, neboť se v ní odehrává řada klíčových dějů. Doposud jediným objeveným amitochondriálním eukaryotem je *Monocercomonoides* sp., u něž funkce mitochondrie zastávají cytosolické dráhy získané horizontálním genovým přenosem z bakterií (Karnkowska et al., 2016).

Patrně nejdůležitější úlohou mitochondrií je produkce adenosintrifosfátu (ATP). Pyruvát a mastné kyseliny dávají v mitochondriální matrix vzniknout acetylkoenzymu A, který vstupuje do Krebsova cyklu. Tímto cyklem vznikají redukované koenzymy, dodávající elektrony elektronovému transportnímu řetězci (ETC) ve vnitřní membráně mitochondrie. Elektrony pohánají přenos protonů do mezimembránového prostoru mitochondrie a vzniklý gradient protonů poté pohání syntézu ATP průchodem komplexem ATP syntázy (Osellame et al., 2012).

Právě podle energetického metabolismu - přítomnosti elektronového transportního řetězce a schopnosti produkce ATP - se mitochondrie a MROs dělí do pěti tříd (Santos et al., 2018). Tyto třídy jsou popsány v tabulce 1. U mitosomů, tvořících pátou skupinu, došlo k úplné ztrátě ETC i produkce ATP. Organismy disponující mitosomy syntetizují ATP pouze procesem substrátové

fosforylace v cytosolu (Lindmark, 1980). Zjednodušeně lze tedy říci, že mitosomy jsou redukováné mitochondrie přizpůsobené velmi nízkým hladinám kyslíku a které ztratily přímou roli v energetickém metabolismu buňky.

Tabulka 1: Třídy mitochondrií podle energetického metabolismu. Jako mitochondrii-příbuzné organely se označují 3.-5. třída.

Třídy mitochondrií	Charakteristika	Produkce ATP
1. Aerobní mitochondrie	ETC přítomný	Ano
2. Anaerobní mitochondrie	ETC přítomný, neprodukuje H ₂	Ano
3. H ₂ -produkující mitochondrie	ETC přítomný, produkuje H ₂	Ano
4. Hydrogenosom	ETC není, produkuje H ₂	Ano
5. Mitosom	ETC není	Ne

Kromě produkce ATP došlo v mitosomu pravděpodobně také ke ztrátě dalších důležitých mitochondriálních funkcí, jako například udržování stálé koncentrace vápníkových iontů, účasti na apoptóze či na metabolismu aminokyselin a lipidů. Jedinou doposud známou funkcí jež si mitosomy *G. intestinalis* zachovaly je biosyntéza železosírných (Fe-S) center (Tachezy et al., 2001; Tovar et al., 2003). Železosírná centra jsou důležitým kofaktorem mnoha proteinů napříč eukaryotickým i prokaryotickým spektrem. Velká část se jich podílí jako elektronové přenašeče na energetickém metabolismu, ale plní i další role např. při syntéze aminokyselin či replikaci DNA. Centra syntetizovaná v organelle nejsou využívána pouze v rámci mitosomu/mitochondrie, ale také v dalších kompartmentech (Lill, 2009).

K syntéze Fe-S center a jejich vložení do apoproteinů je zapotřebí řady specializovaných proteinů, které v mitosomech *G. intestinalis* patří do takzvané iron sulphur cluster dráhy (ISC). V první fázi syntézy dochází k sestavení Fe-S center na tzv. „scaffoldových“ proteinech, které napomáhají provázání železa a síry (Agar et al., 2000). Tuto funkci u *G. intestinalis* zřejmě zastává protein IscU (Tovar et al., 2003). Alternativními „scaffoldy“ mohou být proteiny IscA nebo NifU (Jedelský et al., 2011). Síru dodává systému cystein desulfuráza (IscS) jejím uvolněním z L-cysteinu (Tachezy et al., 2001; Lill, 2009). Elektrony pro redukci síry z S⁰ na S²⁻ dodává ferredoxin z doposud neznámého zdroje (Tovar et al., 2003; Dolezal et al., 2005). Zdroj železa rovněž nebyl prozatím v giardii objasněn. V druhé části tvorby Fe-S center dochází k jejich přemístění ze „scaffoldu“ na cílový apoprotein. Transportu center se zúčastní několik proteinů, jejichž přesné funkce zůstávají prozatím neobjasněny. Jsou to především mitosomální chaperony mtHsp70 (a s ním asociovaný faktor pro výměnu nukleotidů Mge1), Jac1, Cpn60 a Cpn10, jejichž funkce pravděpodobně spočívá v uvolnění Fe-S centra z IscU za hydrolýzy ATP (Regoes et al., 2005; Lill, 2009; Jedelský et al., 2011). Procesu se účastní také monothiol glutaredoxin (Grx5) ve formě homodimeru. Uvažuje se o možnosti, že jde o přechodný „scaffold“, vázající nově vzniklé Fe-S centrum při přesunu z IscU na apoprotein (Rada et al., 2009).

Mitosomy *G. intestinalis* nemají kompletní sadu proteinů ISC dráhy přítomnou v mitochondrii. Jedním z příkladů chybějících proteinů je frataxin, který lze nalézt bez výjimky ve všech mitochondriích – jeho deficit vede u člověka ke vzniku neurodegenerativního onemocnění Friedreichovy ataxie (Campuzano et al., 1996). V aerobních mitochondriích je frataxin hlavním

dodavatelem železa do reakce (Yoon and Cowan, 2003). Kromě skládání Fe-S center zajišťuje tento protein v mitochondrii také ochranu před oxidativním stresem a homeostázu železa (Bradley et al., 2000). Prozatím není jasné, zda funkci frataxinu v mitosomu zastává zcela jiný, neznámý protein, či zda jsou tyto funkce pro mitosom postradatelné. Jako možná náhrada frataxinu by mohl sloužit protein IscA, neboť je také schopen vázat železo (Ding and Clark, 2004). IscA je v aerobních mitochondriích a u velké části prokaryot přítomen ve dvou paralogních formách. U *G. intestinalis* byl však nalezen pouze jeden (Vinella et al., 2009). Důvodem absence by mohla být redundance a záměnnost těchto dvou proteinů v anaerobních podmínkách, jak bylo popsáno v buňkách *Escherichia coli* (Vinella et al., 2009).

Prekvapivým zjištěním byla dvojitá lokalizace proteinů Nbp35 a Cia2 v cytosolu a v mitosomech (Pyrih et al., 2016). Tyto proteiny se u kvasinek účastní pouze cytosolické dráhy syntézy Fe-S center (CIA) a navazují na původní syntetické reakce ISC dráhy v mitochondrii (Lill, 2009). Přítomnost CIA komponent uvnitř mitosomů tak ukazuje na jejich těsnější spolupráci v syntéze Fe-S center (Pyrih et al., 2016). Nutno dodat, že způsob transport Fe-S center z mitosomu doposud nebyl vysvětlen.

Srovnávací studie ukazují, že syntéza železosirných center je zřejmě jedinou funkcí, která je společná všem mitochondriím a MROs. To naznačuje, že by tato dráha mohla být hlavním evolučním tlakem, zodpovědným za udržení mitochondrií a především MROs, které ztratily schopnost syntézy ATP, v eukaryotických buňkách (Tachezy et al., 2001; Tovar et al., 2003; van der Giezen and Tovar, 2005; Lill, 2009). Jedinou dosud známou výjimkou je amitochondriální organismus *Monocercomonoides sp.*, který vytváří Fe-S centra pomocí systému získaného horizontálním genovým přenosem z bakterie (Karnkowska et al., 2016).

Postupem času se objevují informace naznačující další možné funkce mitosomů. Objev ortologu rodanázy (thiosulfát sulfotransferázy) v mitosomech *G. intestinalis* naznačil možný podíl organely na metabolismu síry (Martincová et al., 2015). Funkční enzym forfodiesteráza, která se podílí na buněčné signalizaci prostřednictvím hydrolýzy cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), byla rovněž v nedávné době identifikována v mitosomech (Kunz et al., 2017).

2.1.3.3 Mitosomální proteom a jeho studium

První objevy mitosomálních proteinů umožnily bioinformatické metody, které byly následovány experimentálním ověřením proteinové lokalizace, nejčastěji expresí „tagovaných“ proteinů či tvorbou specifické protilátky. Bioinformatické metody jsou použitelné pouze v případě, že je protein svou sekvencí dostatečně podobný homologním proteinům jiných organismů. Velká část doposud objevených mitosomálních proteinů je ovšem natolik divergentní, že je obvyklé bioinformatické algoritmy nejsou schopny rozpoznat. V dalších případech proteiny nelze identifikovat, neboť jsou specifické pouze pro rod *Giardia*.

Prvním proteinem později lokalizovaným do mitosomu byl protein Hsp60. Ten byl objeven díky použití protilátky proti savčímu homologu tohoto proteinu a až následně došlo k jeho identifikaci také bioinformaticky (Soltys and Gupta, 1994; Roger et al., 1998). Řada dalších proteinů již byla rozpoznána pomocí bioinformatického nástroje BLAST s následnou expresí v buňkách

G. intestinalis, analýzou imunoblotů, preparátů a obvykle také fylogenetickou analýzou (Altschul et al., 1990; Morrison et al., 2001; Tachezy et al., 2001; Tovar et al., 2003; Dolezal et al., 2005). Nedostačující BLAST byl postupem času vystřídán programy využívajícími tzv. skrytých Markovových modelů (HMM) (Elias et al., 2008; Dagley et al., 2009; Kunz et al., 2017; Pyrihová et al., 2018).

Dalším krokem v objevování mitosomálních proteinů byly pokusy o izolaci samotných mitosomů, což by při následném použití hmotnostní spektrometrie vedlo k identifikaci velké části mitosomálního proteomu bez nutnosti využití homologních proteinů. Doposud šlo ovšem kvůli limitaci dostupnými metodami spíše o izolaci buněčných frakcí obohacených o mitosomální proteiny. Rada a kolektiv v roce 2009 použili metodu buněčné frakcionace na cytosolickou a membránovou frakci, která byla poté rozdělena centrifugací v sacharózovém gradientu. Pomocí značení známých mitosomálních proteinů byly vybrány frakce obohacené o mitosomální proteiny, které byly následně analyzovány na 2D elektroforéze (Rada et al., 2009). Významnou se ukázala publikace Jedelského a kolektivu z roku 2011, kde pomocí Optiprep gradientové centrifugace (gradientu iodixanolu) buněčného homogenátu a isobarického značení proteinů, umožňujícího odfiltrování kontaminujících proteinů, došlo k identifikaci 139 potenciálních mitosomálních proteinů, z nichž u dvaceti byla posléze mitosomální lokalizace potvrzena mikroskopicky (Jedelský et al., 2011). Právě tato práce odhalila polovinu doposud popsáných členů dráhy pro syntézu Fe-S center v *G. intestinalis*.

Zcela odlišným způsobem studia mitosomálního proteomu jsou analýzy interaktomu známých mitosomálních proteinů. V těchto analýzách je využíváno *in vivo* enzymatické značení pomocí biotin ligázy z organismu *Escherichia coli* (BirA). Ta specificky biotinyluje tzv. biotin akceptorový peptid (BAP tag), připojený k episomálně exprimovanému proteinu. Právě biotin tvoří se streptavidinem jednu z nejsilnějších nekovalentních vazeb v přírodě (Wilchek and Bayer, 1990). Těto vlastnosti je experimentálně využíváno při izolaci biotinylovaných proteinů. Použitím chemického crosslinkeru je navíc možné označený protein kovalentně navázat na blízko ležící potenciální interakční partnery a následně vzniklé komplexy izolovat pomocí magnetických kuliček s navázaným streptavidinem. Izolované proteiny jsou poté identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie a jejich lokalizace ověřena fluorescenční mikroskopií. Tímto způsobem byl identifikován protein Tim44 a řada proteinů o neznámé funkci (Martincová et al., 2015; Pyrihová et al., 2018).

Studiu interaktomu se věnovala také publikace Routa a kolektivu v roce 2016. Zde nebylo využito *in vivo* značení biotinem pomocí BirA, nýbrž byly proteiny izolovány pomocí hemaglutininové značky připojené na studovaný protein. Chemický crosslink byl založen na použití formaldehydu. Autoři zde zdůrazňují využití takzvané reverzní ko-imunoprecipitace, kdy jsou proteiny nejvíce obohacené ko-precipitací se sledovaným proteinem použity pro následnou ko-precipitaci. Pokud se také v jeho interaktomu najde původní studovaný protein na vysoké pozici, znamená to dle autora vysokou podporu možné interakce (Rout et al., 2016).

Seznamy doposud identifikovaných mitosomálních proteinů zobrazují tabulky 2 a 3.

Tabulka 2: Mitosomální proteiny se známou funkcí nebo homologní ke známému proteinu nebo proteinové rodině. Modře jsou označeny proteiny, které se podílejí na syntéze Fe-S center. Proteiny transmembránové transportní dráhy jsou značeny oranžově. Převzato, upraveno a aktualizováno z Pelc, 2018.

ID proteinu	Označení proteinu	Popis proteinu	Zdroj
GL50803_103891	Cpn60	chaperonin 60	Roger et al., 1998
GL50803_29500	Cpn10	chaperonin 10	Jedelský et al., 2011
GL50803_27266	Fdx	ferredoxin	Tovar et al., 2003
GL50803_2013	Grx5	monothiol glutaredoxin 5	Rada et al., 2009
GL50803_1376	GrpE (Mge1)	nukleotidový výměnný faktor	Jedelský et al., 2011
GL50803_17030	HscB (Jac 1)	chaperon DnaJ	Jedelský et al., 2011
GL50803_14581	Hsp70	chaperon	Morrison et al., 2001
GL50803_14821	IscA-2	„scaffold“ protein	Jedelský et al., 2011
GL50803_14519	IscS	cysteindesulfuráza	Tachezy et al., 2001
GL50803_15196	IscU	„scaffold“ protein	Tovar et al., 2003
GL50803_32838	Nfu	„scaffold“ protein	Jedelský et al., 2011
GL50803_9751		Chaperon, DnaJ, typ III	Jedelský et al., 2011
GL50803_9478	GPP	mitosomální procesivní peptidáza	Morrison et al., 2007
GL50803_91252	<i>GiOR-1</i>	paralog Tah18, oxidoreduktáza	Jedelský et al., 2011
GL50803_19230	Pam16	s translokázou asociovaný motor aktivně transportující presekvence	Jedelský et al., 2011
XP_002364144	Pam18	s translokázou asociovaný motor aktivně transportující presekvence	Doležal et al., 2005
GL50803_17161	Tom40	translokáza vnější mitosomální membrány	Dagley et al., 2009
GL50803_14845	Tim44	translokáza vnitřní mitosomální membrány	Martincová et al., 2015
GL50803_15985	VMP	VAMP asociovaný protein	Jedelský et al., 2011
GL50803_10425	Tim17	translokáza vnitřní mitosomální membrány	Pyrihová et al., 2018
GL50803_14939	MOMP35	protein vnější mitosomální membrány	Martincová et al., 2015
GL50803_5161	Sec20, domnělý	Sec20, domnělý	Elias et al., 2008
GL50803_14058	GiPDE	CAMP-specifická 3,5-cyklická fosfodiesteráza 4B	Kunz et al., 2017
GL50803_27910	ortolog rodanázy, domnělý	ortolog rodanázy, domnělý	Martincová et al., 2015

Tabulka 3: Proteiny s ověřenou mitosomální lokalizací k nimž nebyly identifikovány homology. Oranžově jsou označeny proteiny popsané v publikaci Martincová et al., 2015. Modrá značí proteiny nalezené Jedelským et al., 2011. Proteiny identifikované v práci Rout et al., 2016 jsou označeny zeleně. Červeným písmem jsou vyznačeny proteiny mající duální lokalizaci (ER a mitosomy), nelze tedy jednoznačně říci, že jde o mitosomální proteiny. Protein GL50803_5785 jako první identifikovali Elias et al., 2008, v jejichž práci nevykazuje duální lokalizaci, nýbrž je lokalizován do pouze mitosomu.

GL50803_29147	GL50803_9296	GL50803_12229	GL50803_7035
GL50803_15154	GL50803_14939	GL50803_17276	GL50803_7188
GL50803_5785	GL50803_15985	GL50803_10971	GL50803_3491
GL50803_9503	GL50803_22587	GL50803_4852	GL50803_8358
GL50803_21943	GL50803_16386	GL50803_8148	GL50803_16424

2.1.3.4 Transport proteinů přes mitosomální membrány

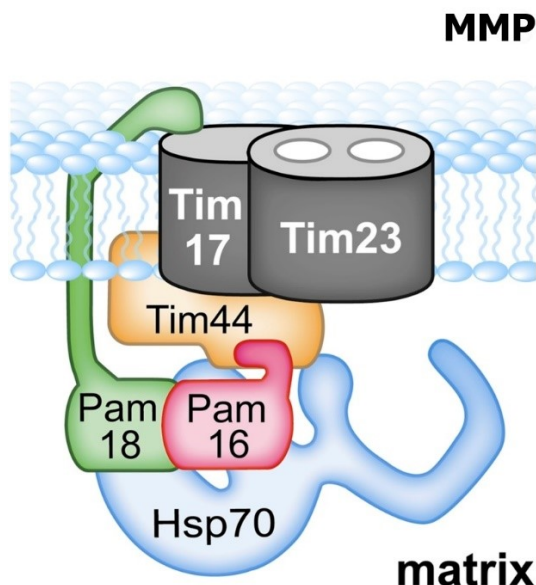
Úplná absence mitosomálního genomu znamená, že veškeré mitosomální proteiny musí být posttranslačně transportovány z cytosolu do organely, a to v rozbaleném stavu (Martincová et al., 2015). Pro správné fungování organely je tedy klíčový transportní systém kanálů a receptorů, umožňující průchod proteinů membránami. Z dosavadních výzkumů vyplývá, že mitosomy *G. intestinalis* mají oproti mitochondrii tento aparát velmi redukovaný.

Podobně jako v mitochondrii, také v mitosomu lze nalézt komplexy translokáz vnější (translocase of the outer membrane, TOM) a vnitřní (translocase of the inner membrane, TIM) membrány a komplex motoru asociovaného s translokázou (presequence translocase-associated motor, PAM). Centrálním prvkem TOM komplexu je porin Tom40 (Dagley et al., 2009; Jedelský et al., 2011). Další homologní proteiny obvykle patřící do tohoto komplexu prozatím nebyly v *G. intestinalis* identifikovány. Několik slibných kandidátů ovšem odhalily analýzy interaktomu proteinu Tom40.

Prvním z těchto proteinů je MOMTiP-1 (GL50803_29147), jehož membránová topologie vzdáleně odpovídá mitochondriálním receptorovým proteinům, zodpovědným za rozeznání signální presekvence (Rout et al., 2016). Dalším je protein se dvěma transmembránovými doménami MOMP35 (také MOMTiP-3; GL50803_14939), který byl nalezen jak v interaktomu proteinu Tom40, tak MOMTiP-1, což naznačuje možnou existenci komplexu těchto proteinů (Martincová et al., 2015; Rout et al., 2016). Skutečná funkční relevance takového komplexu ovšem nebyla ověřena.

Z proteinů komplexu TIM byl v giardii objeven pouze Tim17, který je pravděpodobně homodimerizací schopen tvořit funkční kanál (Pyrihová et al., 2018). Naopak proteiny komplexu PAM, pohánějícího transport proteinů do matrix prostřednictvím TIM komplexu byly v *G. intestinalis* identifikovány téměř všechny, které jsou obvykle pozorovány v kvasinkovém modelu. Jsou jimi chaperon mtHsp70 (Morrison et al., 2001), Tim44 (Martincová et al., 2015), napomáhající jeho interakci s kanálem komplexu TIM, kochaperon s transmembránovou doménou Pam18 (Dolezal et al., 2005), jehož funkcí je zprostředkování spojení proteinu Tim44 s chaperonem mtHsp70 (Mokranjac et al., 2003), a Pam16, s nímž obvykle Pam18 tvoří

heterodimer (Obr. 3) (Jedelský et al., 2011). Přestože v tomto případě Tim44 postrádá N-terminální doménu, obvykle odpovědnou za zprostředkování zmíněné interakce mtHsp70 a centrálních proteinů tvořících kanál komplexu TIM, při izolaci proteinů po chemickém crosslinku se mezi potenciálními interakčními partnery objevoval i mtHsp70, takže jejich interakci nelze zcela vyloučit (Martincová et al., 2015).



Obrázek 3: Schéma uspořádání komplexů TIM a PAM v modelovém organismu *Saccharomyces cerevisiae*. Proteiny Tim17 a Tim23 tvoří kanál pro přenos proteinů z mezimembránového prostoru (MMP) do matrix. Tim23 nebyl v *G. intestinalis* popsán. Heterodimer proteinu Pam18 a Pam16 interaguje s komplexem pomocí N-terminální domény Pam18 s proteinem Tim17 a kontaktu proteinu Pam16 s N-terminální doménou proteinu Tim44. Převzato a upraveno z Schilke et al., 2012.

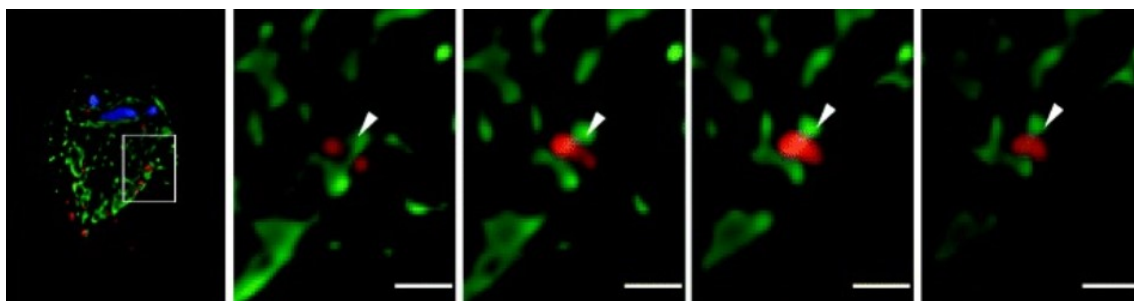
Jedním z proteinů jejichž výskyt byl v *G. intestinalis* očekáván je Sam50. Ten je součástí komplexu sorting and assembly machinery (SAM) a je zodpovědný za vložení beta-barelových proteinů do vnější membrány. Je také považován za protein esenciální pro sestavení importního póru Tom40 (Paschen et al., 2003; Humphries et al., 2005). Ani opakované analýzy genomu parazita a interaktomu proteinu Tom40 ovšem nevedly k odhalení homologu tohoto proteinu (Dagley et al., 2009; Jedelský et al., 2011; Martincová et al., 2015).

Součástí systému zajišťujícího transport proteinů do organel jsou obvykle signální sekvence (Perry et al., 2008). Mitosomální signální sekvence jsou obvykle kratší než je standardem u příbuzné mitochondrie a mohou se vyskytovat v podobě N-terminální presekvence nebo v podobě takzvané vnitřní signální sekvence (Dolezal et al., 2005; Regoes et al., 2005; Šmíd et al., 2008). Stejně jako v mitochondrii, také v mitosomální matrix dochází u proteinů s N-terminální signální sekvencí (např. IscU, ferredoxinu) k odštěpení této sekvence pomocí metaloproteázy (Šmíd et al., 2008). Příklady proteinů s vnitřní signální sekvencí jsou IscS a mtHsp70 (Dolezal et al., 2005).

2.1.3.5 Interakce mitosomu s ostatními organelami

Vzájemná spolupráce jednotlivých organel je klíčová pro správné fungování buňky. Mitochondrie savčích buněk interagují s několika kompartmenty – s endoplasmatickým retikulem, peroxisomy, lysosomy či s cytoskeletárními strukturami. Výzkum interakcí mitosomu s ostatními organelami je však zatím v počátcích.

Interakce mitochondrie s endoplasmatickým retikulem je vůbec nejlépe popsanou interakcí. V místě kontaktu těchto organel vzniká specializovaný kompartment s unikátními vlastnostmi a schopnostmi. Tento kompartment může napomáhat při dělení mitochondrie či při transportu lipidů z místa jejich syntézy (Rowland and Voeltz, 2012). Zdá se, že také mitosomy jsou blízce asociovány s ER, jak ukázalo dvojité fluorescenční značení mitosomů a ER v buňce *G. intestinalis*. Nejen, že se mitosomy nachází v blízkém kontaktu s cysternami ER, také při jejich dělení dochází k jejich prodlužování podél ER (viz obrázek 4) (Voleman et al., 2017).



Obrázek 4: Dělicí se mitosom tvořící kruhovou strukturu kolem cisterny ER. Snímek vlevo znázorňuje maximální projekci snímků Z-vrstev, další obrázky poté průřez buňkou a tedy pohled jednotlivými Z-vrstvami. Jádra jsou značena pomocí DAPI (modrá), ER pomocí anti-PDI2 protilátky (zelená) a mitosomy pomocí anti-GL50803_9296 (červená). Šipka značí dělící se mitosom. Škála znázorňuje velikost 0,5 μm . Převzato z Voleman et al., 2017.

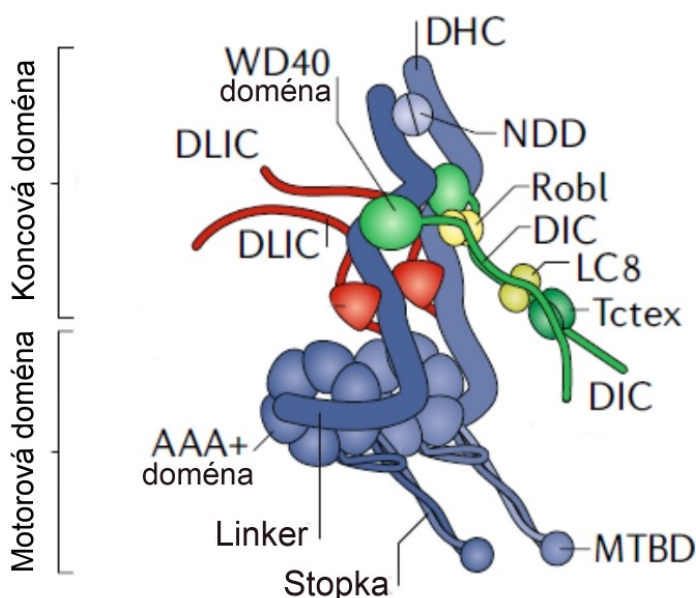
Prozatím jediným popsaným proteinem obohaceným v místě kontaktu mitosomu s ER je long-chain acyl-CoA syntetáza 4 (LACS4). Analýzy topologie proteinu odhalily, že jde o transmembránový protein ER vyčnívající do cytosolu (Voleman et al., 2017). Jde tedy o vhodného kandidáta na protein zajišťující kontakt organel. Rout a kolektiv popsali při studiu interaktomu proteinu Tom40 čtyři proteiny s duální lokalizací do ER a mitosomů (Rout et al., 2016). Jejich případná funkce v interakci těchto membránových organel zůstává nejasná.

Asociace mitosomu s buněčným cytoskeletem může hrát roli v lokalizaci organel v buňce, či se podílet na distribuci mitosomů při dělení buňky. První indikací, že taková interakce existuje, je asociace centrálních mitosomů s bazálními tělísky bičíků při dělení buňky *G. intestinalis* a narušení jejich distribuce při inhibici sestavování mikrotubulů pomocí nocodazolu (Regoes et al., 2005; Voleman et al., 2017). Taková inhibice ovšem nemá vliv na distribuci periferních mitosomů (Regoes et al., 2005). Mechanismus propojení centrálních mitosomů s karyomastigontem a zodpovědné proteiny zatím zůstávají neznámé. Analýzou interaktomu proteinů vnější mitosomální membrány byli identifikováni dva potenciální kandidáti. Těmi jsou s axonemami asociované proteiny, tzv. GASP-180, konkrétně GL50803_137716 a GL50803_16745, dle analýz interagující s mitosomálním proteinem MOMTiP-1 (GL50803_29147) (Rout et al., 2016).

2.2 Dynein

Dyneiny jsou skupinou proteinů tvořících takzvané molekulární motory, které při svém pohybu spotřebovávají ATP, jde tedy o AAA ATPázy (Gibbons and Rowe, 1965). V buňkách lze obvykle nalézt dva typy dyneinů – axonemální a cytoplasmatické. Axonemální dyneiny zajišťují klouzání mikrotubulových dubletů uvnitř axonemy a tím pohání pohyb bičíků. Do této skupiny patří většina dyneinů. Cytoplasmatické obstarávají retrográdní transport nákladu po intracelulárních mikrotubulech. Kráčí tedy k mínus konci, který se nejčastěji nachází v centru buňky. Náklad dyneinů mohou tvořit buněčné organely, váčky, signální molekuly, RNA, velké proteinové komplexy či viry (Reck-Peterson et al., 2018).

Cytoplasmatický dyneinový komplex je u člověka velký přibližně 1,4 MDa a je funkčně složen z několika částí (viz obrázek 5). Nejčastěji jsou zmiňovány motorová doména („head“) hydrolyzující ATP, stopka vázající mikrotubuly a koncová doména („tail“), zajišťující specifický kontakt s nákladem či s regulačními proteiny. Komplex je tvořen šesti proteiny, z nichž je obvykle každý přítomen ve dvou kopiích. Těžký řetězec dyneinu, jehož C-terminální konec tvoří motorovou doménu a N-konec se podílí na tvorbě koncové domény, přesahuje velikost 500 kDa a v komplexu se nachází v jedné, dvou nebo třech kopiích. Střední (intermediární) řetězce o velikosti přibližně 70 kDa se WD40 doménami vážou na těžké řetězce. Lehké střední řetězce jsou taktéž ukotveny na těžkých řetězcích a jejich molekulová hmotnost odpovídá 30 - 60 kDa. Na střední řetězce jsou pak navázány lehké řetězce dyneinu o molekulové hmotnosti 8 - 30 kDa (Reck-Peterson et al., 2018).



Obrázek 5: Struktura cytoplasmatického dyneinového komplexu. Modrá barva znázorňuje těžké řetězce dyneinu (dynein heavy chain, DHC). Microtubule binding domain (MTBD) zajišťuje vazbu na mikrotubuly. Stopka a linker propojují komplex. AAA+ doména zásobuje komplex energií. N-terminální dimerizační doména (NDD) propojuje dva těžké řetězce. Střední řetězce (dynein intermediate chain, DIC) jsou vyznačeny zelenou barvou a provázány s těžkými řetězci pomocí domén WD40. Lehké řetězce Roadblock (Robl), Tctex a LC8 jsou ukotveny na středních řetězcích. Červená barva značí lehké střední řetězce (dynein light intermediate chains, DLIC). Převzato a upraveno z Reck-Peterson et al., 2018.

Nejdůležitějším partnerem cytoplasmatického dyneinu je velký (1 MDa) molekulární komplex dynaktin, v lidských buňkách složený z 23 podjednotek (11 různých), který se váže na střední řetězec dyneinu. Dynaktin je zodpovědný za vazbu rozličných nákladů k dyneinovému komplexu a za jeho regulaci (King et al., 2003). Na dynein se váže také řada dalších proteinů, označovaných jako aktivační adaptory či dyneinové regulátory. Ty regulují vazbu dyneinu na náklad, umožňují stabilnější kontakt s mikrotubuly a s dynaktinem či ovlivňují pohyblivost komplexu (Kardon and Vale, 2009; Reck-Peterson et al., 2018).

Axonemální dyneinové komplexy tvoří dva typy komplexů, tzv. vnější raménka (OAD, outer arm dynein) a vnitřní raménka (IAD, inner arm dynein) (Gibbons, 1963; Gibbons and Rowe, 1965). Vnější raménko je tvořeno buď dvěma nebo třemi (dáno fylogeneticky) vertikálně uspořádanými těžkými řetězci dyneinu, 2 - 5 různými středními řetězci a různým počtem lehkých řetězců, v závislosti na organismu (Gatti et al., 1989; Kamiya, 2002). Organizace vnitřních ramének je výrazně komplexnější. Kupříkladu v buňkách *Chlamydomonas* byly identifikovány tři druhy (7 poddruhů) vnitřních ramének s heterogenní strukturou a skladbou proteinů (Piperno et al., 1990). Obě raménka spolu komunikují pomocí proteinů, tvořících takzvaný outer-inner dynein (OID) linker (Oda et al., 2013). Na kontaktu se mimo jiné podílí právě střední a lehké řetězce.

V publikaci *The cytoskeleton of Giardia lamblia* z roku 2003 autoři uvádí, že dyneiny (stejně jako kinesiny a myosiny) jsou v tomto organismu v podstatě nepopsané (Elmendorf et al., 2003). První důkazy o přítomnosti dyneinu v *G. intestinalis* přišly se sekvenční analýzou genomu (McArthur et al., 2000). Identifikováno bylo 14 genů pro těžké, 3 střední, 10 lehkých a jeden lehký střední řetězec. Na základě informací o predikovaných dyneinech a absenci dynaktinu bylo spekulováno o úplné absenci komplexu cytoplasmatického dyneinu v *G. intestinalis* (Morrison et al., 2007). V rozporu s tímto tvrzením je fylogenetická analýza dyneinů napříč organismy od Wicksteada a Gulla, která zařazuje dva těžké řetězce giardiového dyneinu mezi cytoplasmatické dyneiny (Wickstead and Gull, 2007). U obou řetězců ovšem dlouhé větve naznačují výraznou divergenci, která by mohla vést k nepřesnému zařazení.

Experimentální studie o struktuře a funkci dyneinů *G. intestinalis* doposud chybí. Publikované práce se zabývají výhradně neobvyklým způsobem sestřihu mRNA pro těžký řetězec dyneinu a složitostí jeho exprese. V genomu je tento gen kódován ve dvou vzdálených nekompletních částech a ke spojení mRNA molekul dochází mechanismem trans-splicing (Kamikawa et al., 2011; Roy et al., 2012).

2.2.1 Mitochondriální transport zprostředkovaný dyneinovými motory

Mitochondrie jsou v buňce přesouvány jak po mikrotubulech, tak po aktinových mikrofilamentech. Pohybují se, zastavují a mění směr v závislosti na metabolických požadavcích buňky (Saxton and Hollenbeck, 2012). Cytoplasmatický dynein slouží k přesunu mitochondrie k mínusovému konci mikrotubulu. Regulátory pohybu mitochondrií po mikrotubulech jsou pravděpodobně adaptorové proteiny Milton (v savcích buňkách proteiny TRAK1 a TRAK2) a Mito, a to jak při transportu pomocí dyneinu, tak při anterográdním pohybu pomocí kinesinu (van Spronsen et al., 2013; Melkov et al., 2016).

Jak již bylo zmíněno, v giardii nebyla ve fázi trofozoita pozorovaná fúze ani dělení mitosomů (Voleman et al., 2017). Ačkoli vzhledem k pohyblivosti buněk nelze s jistotou říct, že mitosomy zůstávají trvale na jednom místě, nebyl doposud pozorován žádný orientovaný pohyb v rámci buňky. Naproti tomu není znám způsob ani konkrétní protein, který by kotvil organely na jednom místě. Vzhledem k blízkému kontaktu se nabízí možnost ukotvení mitosomů pomocí ER (Voleman et al., 2017).

3 Cíle práce

1. Bioinformatická analýza potenciálního interaktomu *GiTom40* a výběr vhodných kandidátů pro laboratorní práci
2. Vytvoření konstruktů a exprese v *G. intestinalis*
3. Determinace lokalizace proteinů v buňce pomocí fluorescenční mikroskopie
4. Podrobná charakterizace jednoho z vybraných proteinů
5. Izolace proteinů interagujících s vybraným proteinem

4 Materiál a metodika

4.1 Organismy a jejich kultivace

4.1.1 *Escherichia coli*

Kompetentní bakterie *E. coli* kmenu TOP10 byly používány pro namnožení zkonstruovaných plasmidů. Bakterie byly kultivovány při teplotě 37 °C v LB médiu (Sigma) s přidáním selekčním antibiotikem ampicilinem (Sigma) o koncentraci 100 µg/ml za stálého třepání (220 rpm) přes noc.

4.1.2 *Giardia intestinalis*

V naší práci byly použity trofozoity *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Organismus byl kultivován jako axenická kultura při 37 °C v modifikovaném médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s přidanou 0,1% hovězí žlučí a 10% hovězím sérem (Gibco). Do média byla dle potřeby aplikována selekční antibiotika: puromycin (výsledná koncentrace 54 µg/ml; PAA laboratories), G418 (0,6 mg/ml; Gold biotechnology) a blasticidin (76 µg/ml; Gold biotechnology).

4.2 Bioinformatické nástroje

Základní informace jako anotace a sekvence zkoumaných genů byly čerpány z databáze GiardiaDB (www.giardiadb.org). Pro vyhledání transmembránových helixů byl použit program TMHMM Server (Krogh et al., 2001). Pfam databáze (Finn et al., 2014) sloužila k zařazení proteinů do popsaných proteinových rodin a k vyhledání klasifikovaných domén. Pro vyhledání homologních proteinů byly použity programy BlastP (Altschul et al., 1990) a HHpred (Soding et al., 2005; Zimmermann et al., 2018), jejichž predikce byly následně porovnány. Signální peptidy byly v sekvencích vyhledány pomocí SignalP 4.1 (Nielsen et al., 1997; Nielsen, 2017).

Pro bližší charakterizaci a získání informací o anotaci proteinu GL50803_6939 byla využita UniProtKB databáze (UniProt Consortium, 2018). K predikci funkce proteinu a jeho lokalizace byl využit webový program projektu GeneOntology (geneontology.org; Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Známé domény proteinu predikoval program InterPro (Mitchell et al., 2019). Pomocí programu I-TASSER byly predikovány 3D modely proteinů (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang and Zhang, 2015).

Pro vytváření a editaci alignmentů sekvencí proteinů byl využíván software MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Veškeré alignmenty v této práci jsou v rámci MEGA 7.0 vytvářeny programem ClustalW (Thompson et al., 1994). Pomocí programu PhyML (Guindon et al., 2010) byly prováděny fylogenetické analýzy metodou „maximum likelihood“, substituční model LG, bootstrap 100. Program vygeneroval fylogenetické stromy se statistickou podporou větví. Tyto stromy byly opět editovány v programu MEGA 7.0. Přístupová čísla všech používaných sekvencí proteinů a zdrojové databáze jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Přístupová čísla sekvencí proteinů využívaných při fylogenetických analýzách.

Organismus	Přístupové číslo	Databáze
<i>G. intestinalis</i> (6939)	A8BT37	UniProt
<i>G. intestinalis</i> (33218)	A8BM39	UniProt
<i>G. intestinalis</i> (10254)	A8B6X4	UniProt
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	G1M7W9	UniProt
	G1L3C6	UniProt
	G1LV13	UniProt
	G1LPT1	UniProt
<i>Brachionus muelleri</i>	A0A3M7SNE9	UniProt
	A0A3M7R6C7	UniProt
<i>Camponotus floridanus</i>	E1ZZ33	UniProt
	E2B285	UniProt
<i>Heliocidaris crassispina</i>	Q16960	UniProt
	Q16959	UniProt
<i>Homo sapiens</i>	NP_036276	NCBI
	NP_001268357	NCBI
	NP_004402	NCBI
	NP_001258714	NCBI
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C7A2A8	UniProt
	A8J3B6	UniProt
	Q5XPS1	UniProt
	P27766	UniProt
	Q39578	UniProt
<i>Leishmania major</i>	Q4Q2D4	UniProt
	E9ADE2	UniProt
	Q4Q3S3	UniProt
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021424592	NCBI
	XP_021436972	NCBI
<i>Plasmodium falciparum</i>	Q8I2T3	UniProt
	Q8IJJ9	UniProt
<i>Trypanosoma cruzi</i>	A0A2V2XFA1	UniProt
	A0A2V2UU51	UniProt
	A0A2V2VUM1	UniProt

4.3 Plazmidy

Pro expresi proteinů v organismu *G. intestinalis* byl použit modifikovaný plasmid pOCT-PP2Aas (Lauwaet et al., 2007), pracovně označovaný „pTG“, obsahující silný promotor genu pro ornitin-karboyl transferázu (OCT). Plasmid pTG obsahuje na rozdíl od původního restrikční místa NdeI a PstI a dvojitý hemaglutininový (HA) tag (Martincová et al., 2012), ovšem stejně jako původní nese gen pro puromycinovou rezistenci. Cytosolická BirA byla vložena do plasmidu pUC57-mini s insertem navrženým v naší laboratoři a syntetizovaným firmou GenScript. Insert obsahuje promotor pro giardiovou Acetyl-CoA acetyltransferázu (GL50803_3287), V5-tag a gen pro blasticidinovou rezistenci řízený promotorem pro pyruvátkinázu (GL50803_9909).

4.4 Konstrukty

Sekvence genů tvořících konstrukty byly čerpány z databáze GiardiaDB. Schéma všech vytvořených insertů znázorňuje obrázek 6. Do genů kódujících vybrané proteiny (Obr. 6, 1.-6.) byly pomocí reverzního primeru vloženy BAP tag a STOP kodon. Všechny tyto proteiny byly vloženy do plazmidu pTG. Insert nesoucí BirA (Obr. 6, 7.) byl vložen do plasmidu pUC57-mini. V tabulce 5 jsou uvedeny molekulární hmotnosti proteinů kódovaných geny zájmu.

1.	AseI	GL50803_114210	BAP	STOP	ApaI
2.	NdeI	GL50803_91712	BAP	STOP	ApaI
3.	AseI	GL50803_137685	BAP	STOP	PstI
4.	AseI	GL50803_96818	BAP	STOP	ApaI
5.	NdeI	GL50803_6939	BAP	STOP	PstI
6.	AseI	GL50803_31295	BAP	STOP	NsiI
7.	BamHI	BirA	V5	MluI	

Obrázek 6: Vytvořené inserty. Bíle jsou uvedeny geny kódující proteiny zájmu. Geny 1. až 6. byly klonovány do plazmidu pTG, gen 7. do pUC57-mini. Žlutě jsou uvedeny tagy přidávané do konstruktů, později používané k detekci proteinů. Červeně jsou znázorněna umístění STOP kodonů. Modře jsou uvedena použítá restrikční místa.

Tabulka 5: Molekulová hmotnost zkoumaných proteinů.

Zkoumaný protein	Molekulová hmotnost (kDa)
GL50803_114210	120
GL50803_91712	77
GL50803_137685	79
GL50803_96818	54
GL50803_6939	70
GL50803_31295	83
BirA	36

4.5 Amplifikace genů

Geny zájmu byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Templátem byla genomová DNA *G. intestinalis* získaná z buněk pomocí Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Gen pro BirA byl amplifikován z plasmidu BirA-pONDRA poskytnutého Mgr. Lenkou Markovou. Byly navrženy specifické primery pro jednotlivé geny, s restrikčními místy umožňující ligaci do zvolených plasmidů. Při navrhování primerů byla zohledněna teplota nasedání (T_a) a teplota tání (T_m) a primery byly analyzovány pro výskyt dimerů a vlásenek pomocí nástroje OligoAnalyzer (Owczarzy et al., 2008). Ve forward primerech bylo třeba dodržet umístění START kodonu ve správném čtecím rámci. Do reverse primerů vybraných genů byla přidána sekvence BAP tagu potřebného pro plánované pokusy, za nějž byl umístěn STOP kodon – ten byl v původní sekvenci genu odstraněn. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Primery použité k amplifikaci genů. Tučně jsou označeny restrikční enzymy a příslušné úseky v sekvenci. Červeně jsou vyznačeny STOP kodony. Kurzívou je vyznačen BAP tag.

GL50803_114210, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (AseI)	CATGATTAATGATCTGCTTGACCTGGCTTCTAG
Reverse (ApaI)	CAGTGGGCCCCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCGAGGATTGACACCCACCAC
Při amplifikaci byla zjištěna komplementarita reverse primeru také k úseku přibližně vprostřed požadovaného genu. Byl proto navržen nový, delší primer, specificky nasedající pouze na koncový úsek genu.	
Reverse (ApaI)	CAGTGGGCCCCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCGAGGATTGACACCCACCACTAACGCTTTGGATAC

GL50803_91712, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (NdeI)	CATGCATATGTCGCCCGATGAGCGTAG
Reverse (ApaI)	CAGTGGGCCCCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCGTCCAGTTTCCCATAAAGTC

GL50803_137685, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (AseI)	CATGATTAATATGACTGTTAGACATTCCCTG
Reverse (PstI)	CAGTCTGCAGCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCAAAGTTCAGCGAATCCTTTAC

GL50803_96818, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (AseI)	CATGATTAATATGGACATTAAACAGGATATGAAGGAC
Reverse (ApaI)	CAGTGGGCCCCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCACTCACATTCAAAGCCGTG

GL50803_6939, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (NdeI)	CAGTCATATGGAGATCACCTACGTGTACG
Reverse (PstI)	CAGTCTGCAGCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCAAATGTAAAGTTGCCATACTCGTC

GL50803_31295, v reverse primeru přidán BAP tag	
Forward (AseI)	CATGATTAATGTCTAAGAGAAGCCAACCG
Reverse (NsiI)	CAGTATGCATCTATTCTGCGCTTCGAAGATATCG TTAAGACCGTCCAACACATTAGACTTACTTAC

BirA v plasmidu pONDRA	
Forward (BamHI)	GATCGGATCCATGAAGGATAACACCGTG
Reverse (MluI)	GATCACGCGTTTTTCTGCACTACGCAG

Složení 25 µl PCR reakce:

5x Q5 Reaction buffer (NEB)	5 µl
Forward primer (10 µM)	1,25 µl
Reverse primer (10 µM)	1,25 µl
Templátová DNA (plasmid/gDNA)	0,5 - 1 µl
10 mM dNTP (Fermentas)	0,5 µl
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymeráza (NEB)	0,25 µl
dH ₂ O	variabilní

V případě neúspěchu prvotní amplifikace se základním složením bylo v individuálních případech dle potřeby měněno složení PCR reakce. Při amplifikaci GL50803_31295 bylo třeba k reakci přidat 5 µl 5x Q5 High GC Enhanceru (NEB). V případě GL50803_114210 vedlo k úspěšné amplifikaci přidání 0,25 µl DMSO (Sigma) napomáhajícího denaturaci.

PCR program (viz tabulka 7) byl pro amplifikaci genů zvolen na základě empirické zkušenosti a předchozí vysoké úspěšnosti i u špatně amplifikovatelných genů. U dlouhého genu GL50803_114210 byly elongační fáze prodlouženy na 90 s.

Tabulka 7: PCR program.

Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
98	30	1
98	8	20
65	20	
72	50	
98	8	15
45	20	
72	50	
72	300	1
15	∞	

4.6 Izolace a klonování DNA fragmentů

Amplifikovaná DNA byla analyzována na horizontální agarózové elektroforéze. Vzorek byl smíchán s 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific) a nanesen do gelu s přidaným DNA barvivem SYBR® Safe (Invitrogen), které umožnilo zobrazení pomocí UV světla. Velikost fragmentů DNA byla srovnávána s Gene-Ruler DNA Ladder (Thermo Scientific). Pozitivní vzorek byl vyříznut a přečištěn pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

Po amplifikaci následovala restrikce insertů a plasmidů restrikčními endonukleázami (Thermo Scientific, NEB) dle protokolu. Produkty restrikce byly ligovány T4 ligázou při teplotě 16 °C přes noc.

4.7 Transformace bakterií *E. coli*

Plasmidy s vloženými inserty byly do bakterií introdukovány pomocí heat shock reakce při teplotě 42 °C po dobu 30 vteřin a následného zchlazení na ledu. Po 10 minutách bylo přidáno 250 µl SOC média a bakterie byly inkubovány po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C na třepačce. Bakterie byly poté nanášeny na agarovou LB plotnu s přidáním selekčním antibiotikem ampicilinem v koncentraci 100 µg/ml (Sigma). Plotna byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C. Následně bylo náhodně vybráno několik kolonií pro otestování úspěšné transformace rekombinantními plasmidy. Vzorek kolonie byl rozmíchán v 50 µl dH₂O a malé množství bylo odebráno pro degradaci bakterií. Přítomnost plasmidu v bakteriích byla ověřena pomocí PCR reakce za podmínek shodujících se s amplifikační reakcí, kdy jako templátová DNA posloužila DNA degradovaných bakterií. Vzorky byly analyzovány pomocí agarózové elektroforézy.

Pozitivní kolonie byly kultivovány v objemu 6,5 ml LB s přidáním antibiotikem ampicilinem (0,1 µg/ml) přes noc při 37 °C na třepačce. Plasmidy byly z bakterií izolovány pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) a koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena přístrojem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly následně podrobeny kontrolní restrikci pomocí endonukleáz specificky vybraných pro daný rekombinantní plasmid (viz tabulka 6). U vzorků s pozitivním výsledkem byla DNA osekvenována pro kontrolu případného výskytu nežádoucích mutací.

4.8 Transfekce buněk *G. intestinalis*

Transfekce *G. intestinalis* byla prováděna za sterilních podmínek. Z kultury buněk tvořící jednolitou vrstvu v 70ml kultivační lahvi bylo odlito původní médium a nahrazeno ledovým sterilním fyziologickým roztokem (PBS). Lahev byla chlazená ledem po dobu 20 minut. Buňky byly poté centrifugovány při 1000 x g po dobu 10 minut při 4 °C. Buněčný pelet byl resuspendován v 500 µl TYI-S-33 média. Pomocí přístroje Z2 Coulter Counter (Beckman) byla spočítána koncentrace buněk v suspenzi. Pro transfekci bylo třeba buňky naředit na koncentraci $3,3 \times 10^7$ buněk/ml. Do 4mm elektroporačních kyvet (Bio-Rad) bylo napipetováno 300 µl této buněčné suspenze a 50 µg plasmidové DNA. Po promíchání byla kyveta ponechána na ledu po dobu 15 minut.

Pro elektroporaci přístrojem Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) byl užíván jeden ze dvou protokolů: „exponenciální“ (350 V, 1000 µF, 750 Ω) nebo „time constant“ (350 V, 175 ms). „Time constant“ protokol byl obvykle zkoušen v případě, kdy byl „exponenciální“ protokol opakovaně neúspěšný. Po elektroporaci byly buňky opět kultivovány na ledu po dobu 5 minut a následně přeneseny do připravené zkumavky s TYI-S-33 médiem a ponechány ve 37 °C.

Po 24 hodinách bylo médium nahrazeno čerstvým s přidáním selekčními antibiotiky (puromycin, G418, blasticidin). Médium bylo poté měněno podle potřeby, obvykle po 72 hodinách. Jakmile buňky vytvořily ve zkumavce jednolitou vrstvu, bylo možné je začít pravidelně očkovat.

4.9 SDS-PAGE

Pro přípravu vzorku na SDS-PAGE elektroforézu bylo nutné kulturu buněk zchladit na ledu po dobu 10 minut, stočit při 1000 x g a 4 °C po dobu 10 minut a získaný pelet resuspendovat v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru. Vzorek byl uvařen při 95 °C po dobu 5 minut.

Získaný roztok byl nanesen do 0,75mm 12% akrylamidového rozdělovacího gelu s 5% zaostřovacím gelem. Jako standard molekulové hmotnosti proteinů sloužil PageRuler Plus (Thermo Scientific). Proteiny byly separovány při napětí 90 V až do přechodu do rozdělovacího gelu, pak bylo napětí zvýšeno na 150 V.

Jako vizuální kontrola nanesení shodného množství proteinu byl gel barven roztokem Coomassie Brilliant Blue (Serva) přes noc za stálého kývání. Gel byl poté promýván odbarvovacím roztokem přibližně 24 hodin. Na závěr byl gel promyt destilovanou vodou.

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue:

- 0,5% Coomassie Brilliant Blue (ThermoFisher)
- 40% metanol (Lach-ner)
- 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok:

- 25% metanol (Lach-ner)
- 10% kyselina octová

4.10 Western blot

Z akrylamidového gelu byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Amersham) pomocí blotovacího aparátu Biometra Fastblot při proudu 1,5 mA/cm² po dobu 70 minut. Kvalita přenosu proteinů byla ověřena 0,5% barvivem Ponceau S (Sigma) v 1% kyselině octové. Membrána s proteiny byla 1 hodinu blokována v 5% odtučněném sušeném mléku (Sigma) rozpuštěném v PBS s 0,15% Tween 20 (Sigma) při pokojové teplotě na kývačce. Zablockovaná membrána byla inkubována s primární protilátkou (viz 4.10.1) naředěnou v roztoku mléka po dobu jedné hodiny na kývačce. Protilátka byla odmyta roztokem mléka třikrát po dobu 10 minut. Následně byla membrána inkubována se sekundární protilátkou (viz 4.10.1) ředěnou v roztoku mléka po dobu jedné hodiny. Po označení protilátkami bylo třeba membránu promýt fyziologickým roztokem 3 x 15 minut.

Při použití sekundární protilátky s křenovou peroxidázou (HRP) byla membrána 5 minut inkubována se substrátem Luminata Western HRP substrate (Merck Millipore) síly crescendo nebo forte a následně vyvolána přístrojem Amersham Imager 600 (GE Life Sciences).

Při použití sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou (AP) byl na membránu nanesen předpřipravený substrát, směs 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu (BCIP) a nitro blue tetrazolium chloridu (NBT). Membrána byla krátce inkubována ve 37 °C.

4.10.1 Použité protilátky

Pro proteiny s navázaným BAP tagem byly používány dva typy protilátek. První typem byla primární monoklonální α -BAP protilátka z králíka (GenScript) nebo z myši (GenScript) v ředění 1:1000. Druhým typem byl konjugát streptavidinu s Alexa Fluor 488 (Invitrogen), používaný v ředění 1:500, který má vysokou afinitu k biotinu vázanému k BAP tagu, je tedy zároveň kontrolou biotinylation. Pro konstrukt BirA-V5 byla používána primární myší protilátka α -V5 (Sigma) v ředění 1:2000.

Sekundární protilátky používané na imunoblotty byly jak konjugáty s alkalickou fosfatázou (Invitrogen), tak s křenuvou peroxidázou (Invitrogen). Byly vybrány s ohledem na zvolenou primární protilátku (anti-myší, anti-králíčí) a ředěny 1:2000.

4.11 Příprava preparátů pro mikroskopii

Buňky *G. intestinalis* připravované pro mikroskopii na přístroji Nikon Eclipse Ti-S byly fixovány metanolem/acetonem. Preparáty určené pro superrezoluční STED mikroskopii bylo nutné fixovat pomocí paraformaldehydu, který mimo jiné umožní fixaci buněk na krycím sklíčku, což vede ke zlepšení pozorovacích podmínek.

4.11.1 Fixace buněk metanolem/acetonem

Kultura *G. intestinalis* byla zchlazena na ledu po dobu přibližně deseti minut pro uvolnění buněk adherováných na stěně zkumavky. Za pomoci injekční stříkačky byly buňky vpraveny do anaerobní komůrky a inkubovány 15 minut ve 37 °C. Komůrka byla rozebrána a po mírném zaschnutí byly buňky fixovány nejprve po dobu pěti minut v chlazeném metanolu (-20 °C) a poté pět minut permeabilizovány v chlazeném acetonu (-20 °C). Po uschnutí byla sklíčka uchovávána v lednici.

4.11.2 Fluorescenční značení preparátů fixovaných metanolem/acetonem

Značení preparátů probíhalo ve vlhké komůrce, zabraňující vysychání preparátů, za pokojové teploty. Nejprve byly preparáty zablokovány blokovacím roztokem (300 μ l/preparát) po dobu jedné hodiny. Následně proběhla hodinová inkubace s primární protilátkou (viz 4.11.5) naředěnou v blokovacím roztoku. Poté bylo preparát třeba promýt fyziologickým roztokem 3x 10 minut. Inkubace se sekundární protilátkou ředěnou v blokovacím roztoku probíhala bez přístupu světla po dobu jedné hodiny. Nakonec byl preparát znovu promyt PBS identickým způsobem, taktéž bez přístupu světla.

Po odstranění PBS a osušení byla do středu preparátu aplikována malá kapka montovacího média VECTASHIELD® s DAPI (Vector), preparát byl zakryt krycím sklíčkem a po okrajích fixován pomocí laku na nehty.

Blokovací roztok pro preparáty:

- PBS
- 0,25% želatina (Sigma)
- 0,25% BSA (Sigma)
- 0,05% Tween 20 (Sigma)

4.11.3 Paraformaldehydová fixace buněk

Do kultury buněk byl přidán paraformaldehyd (EMS) v 1% koncentraci a kultura byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Poté byly buňky zchlazeny na ledu a centrifugovány 5 minut při 1000 x g. Původní médium bylo vylito a pelet byl resuspendován v 1 ml 1x PEM pufru. Poté byly buňky zcentrifugovány znovu stejným způsobem a resuspendovány v 300 µl 1x PEM pufru.

Na krycí sklíčko bylo nanášeno 10 µl polylysinu (Sigma) a třením s druhým krycím sklíčkem byl polylysin roz distribuován. Obě sklíčka byla položena polylysinem vzhůru do šestijamkové destičky. Na celou plochu sklíčka bylo rozprostřeno 150 µl roztoku s buňkami. Po 15 minutách byl roztok odstraněn a sklíčko bylo promyto třikrát 1x PEM pufrem po dobu půl minuty. Na sklíčko byl opatrně nakapán 1 ml 0,1% Tritonu X-100 (Sigma) v 1x PEM. Po deseti minutách bylo sklíčko promyto stejným způsobem.

4.11.4 Fluorescenční značení preparátů fixovaných paraformaldehydem

Připravené sklíčko se zařizovanými buňkami bylo půl hodiny blokováno v roztoku PEMBALG (0,5 ml). Následně byla na sklíčko nanášena primární protilátka naředěná ve 100 µl roztoku PEMBALG. Po hodinové inkubaci bylo sklíčko 3x promyto roztokem 1x PEM po dobu 10 minut. Sekundární protilátka byla také naředěna v roztoku PEMBALG a inkubována 1 hodinu na sklíčku bez přístupu světla. Po inkubaci se sekundární protilátkou byl preparát opět promyt.

Pro STED mikroskopii bylo nutné použít speciální vysokorezoluční montovací média TDE Mounting Medium (Abberior). Na sklíčko bylo nanášeno malé množství média A, které bylo po chvíli odsáto a nahrazeno médiem B. Stejným způsobem jsme pokračovali s médiem C a D, přičemž D bylo aplikováno dvakrát. Malá kapka montovacího média D byla nanášena také na podložní sklíčko. Na připravené podložní bylo položeno krycí sklíčko a hotový preparát byl zařizován lakem na nehty po okrajích krycího sklíčka.

PEM pufr:

- H₂O
- 200mM PIPES (Sigma)
- 2mM EGTA (Sigma)
- 0,2mM MgSO₄ (Sigma)
- pH 6,9; sterilizace v autoklávu

PEMBALG:

- 1x PEM
- 1% BSA (Sigma)
- 100mM lysin (Sigma)
- 0,5% želatina (Sigma)

4.11.5 Protilátky použité na preparátech

Protilátky užívané ke značení proteinů s BAP tagem jsou identické s protilátkami uvedenými v kapitole 4.10.1 a byly používány ve stejném ředění. Konstrukt BirA-V5 byl značen myší protilátkou α-V5 (Sigma) ředěnou 1:2000. Pro značení mitosomů byla použita králičí primární protilátka α-Tom40 vlastní produkce v ředění 1:5000.

Preparáty byly značeny sekundárními protilátkami s navázanou fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 (králík, myš; Invitrogen) nebo 594 (králík; Invitrogen). Pro STED byly použity sekundární protilátky Abberior STAR 635P (králíci) a STAR 580 (myši) v ředění 1:200.

4.12 Frakcionace trofozoitů *G. intestinalis*

Kultivační lahev s kulturou *G. intestinalis* byla zalita vychlazeným PBS a zchlazena na ledu. Suspenze buněk byla centrifugována při 1200 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Získaný pelet byl resuspendován v ST pufru s blokátory proteáz N-tosyl-L-lysin chlormetyl ketonem (TLCK; 50 µg/ml) a leupeptinem (LEU; 10 µg/ml). Buňky byly rozbity sonikací s amplitudou 40 po dobu 90 sekund s délkou pulsu 1 sekundu. Malá část vzorku byla odebrána jako frakce buněčného lyzátu. Po sonikaci byly buňky stočeny při 2700 x g a 4 °C po dobu 20 minut. Odebraný supernatant byl následně stočen na ultracentrifuze po dobu 30 minut při 180 000 x g a 4 °C. Výsledný vzorek byl rozdělen na dvě frakce: supernatant reprezentoval cytosolickou frakci (CYT) a „high-speed“ pelet (HSP) resuspendovaný v SM pufru s blokátory proteáz frakci obsahující membrány a organely. Vzorky byly uchovávány v -80 °C.

SM pufr:

- 250mM sacharóza
- 20mM MOPS (Sigma)
- pH 7,4

4.13 Laboratorní determinace topologie proteinu

4.13.1 Analýza odolnosti vůči trypsinu

Frakce HSP byla naředěna SM pufrém s přidáním inhibitory proteáz (SM+I) na koncentraci proteinů 7,5 mg/ml. Následně byly připraveny tři reakce, jejichž schéma je znázorněno v tabulce 8. Namíchané roztoky byly inkubovány při 37 °C po dobu 10 minut. Po proběhnutí reakcí bylo do směsi přidáno 50 µl 1x koncentrovaného vzorkového pufru a směsi byly inkubovány při 95 °C po dobu 5 minut. Výsledky pokusu byly analyzovány pomocí western blotu. Kontrolou správného provedení pokusu bylo vytvoření tří stejných membrán s identicky nanesenými vzorky, přičemž první membrána byla značena α-BAP primární protilátkou (králíci, 1:1000, GenScript), druhá membrána α-IscU (GL50803_15196; králíci, 1:1000; vlastní produkce) a třetí α-Tom40 (GL50803_17161; králíci, 1:5000; vlastní produkce). IscU zastupovalo proteiny uzavřené uvnitř mitosomu, k nimž trypsinová proteáza nemá přístup, kdežto Tom40 je protein typicky se vyskytující ve vnější membráně mitosomu, je tedy vystaven působení trypsinu.

Tabulka 8: Složení reakcí analýzy odolnosti vůči trypsinu.

1	2	3
20 µl HSP	20 µl HSP	20 µl HSP
30 µl SM+I	28 µl SM+I	23 µl SM+I
	2 µl Trypsin (5 mg/ml)	2 µl Trypsin (5 mg/ml)
		5 µl 1% Triton (= 0,1%)

4.13.2 Extrakce uhličitanem sodným

Po přípravě čerstvého 1M Na₂CO₃ (PENTA) o pH 11 bylo 200 µl smícháno s 50 µl HSP. Po dobu jedné hodiny byl vzorek střídavě minutu chlazen na ledu a minutu vortexován. Následně byl roztok stočen 30 minut při 100 000 x g a 4 °C. Supernatant (SUP) byl odebrán a uchován a pelet (PEL) byl resuspendován v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru. Supernatant (SUP) byl smíchán s kyselinou trichlorovou (Lach-ner) do výsledné 20% koncentrace kyseliny. Vzorek byl inkubován 30 minut na ledu a poté stočen 10 minut při 30 000 x g a 4 °C. Ze stočeného vzorku byl odstraněn supernatant a na vzniklý pelet bylo napipetováno 0,5 ml vychlazeného acetonu (Lach-ner). Vzorek byl promíchán dvakrát převrácením a stočen 10 minut při 30 000 x g a 4 °C. Opět byl odstraněn supernatant a zkumavka byla ponechána na stole do vypaření acetonu. Zaschlý pelet byl resuspendován ve stejném množství 1x koncentrovaného vzorkového pufru jako PEL. Oba vzorky byly inkubovány při 90 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly analyzovány pomocí western blotu.

4.14 Analýza interagujících proteinů

Pro vyhledání proteinů interagujících s proteiny zájmu byla použita metoda chemického crosslinku v celých živých buňkách pomocí dithiobis(succinimidyl propionátu) (DSP). Pro přečištění a izolování komplexu proteinů bylo následně využito vysoké afinity biotinu ke streptavidinu a byly tedy použity Dynabeads magnetické kuličky s navázaným streptavidinem. Získaný komplex proteinů byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie. Pomocí modré nativní gelové elektroforézy byly zjišťováno, zda zkoumané proteiny tvoří za nativních podmínek v buňce komplexy.

4.14.1 Testování optimální koncentrace crosslinkeru

Pro otestování vhodné koncentrace crosslinkeru bylo nutné kulturu napěstovat v kultivační lahvi o objemu 250 ml. Kultura byla zalita zchlazeným PBS a inkubována na ledu do uvolnění buněk. Buňky byly stočeny při 1200 x g a 4 °C po dobu 10 minut a získaný pelet byl resuspendován v 1 ml PBS s inhibitory proteáz. Ze suspenze bylo odebráno 10 µl, které byly lyzovány pomocí 1% dodecylsírany sodném (SDS). Pomocí Protein assay kit (Bio-Rad) byla poté změřena koncentrace proteinů ve vzorku. Vzorek byl naředěn na koncentraci 1 mg/ml.

Po zjištění koncentrace proteinu ve vzorku byl připraven roztok DSP v DMSO, který byl použit na otestování vhodné koncentrace. Zkoušené koncentrace DSP byly 2,5µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM a 1mM. Jako kontrola byl použit vzorek s 5 µl DMSO bez DSP. DSP bylo přidáno v uvedených koncentracích ke 20 µl suspenze buněk v PBS s inhibitory proteáz a inkubováno hodinu na ledu. K zastavení reakcí byl použit 50mM Tris (Sigma) o pH 7,4 a roztoky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly stáčeny při 30 000 x g a 4 °C po dobu 15 minut a získané pelety byly resuspendovány v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru, přičemž jeden vzorek s 1mM DSP sloužící jako druhá kontrola byl resuspendován ve vzorkovém pufru s merkaptetoetanolem a zbylé vzorky v pufru bez merkaptetoetanolu. Všechny vzorky včetně kontrol byly inkubovány při 95 °C po dobu 5 minut a následně analyzovány metodou western blot.

4.14.2 Chemický crosslinking

Pro chemický crosslinking bylo třeba napěstovat kultury buněk *G. intestinalis* v objemu 750 ml. Pěstována byla kultura buněk exprimujících studovaný protein a zároveň cytosolickou BirA a jako kontrola buňky exprimující pouze BirA. Kultury byly zality ledovým PBS a chlazeny na ledu do uvolnění buněk od stěny lahve. Pelet buněk získaný stáčením po dobu 10 minut při 1200 x g a 4 °C byl resuspendován ve 2 ml PBS s inhibitory proteáz. Z této suspenze bylo odebráno 20 µl jako kontrolní alikvót A0. Ze zbylého vzorku bylo odebráno 10 µl, které byly lyzovány pomocí 1% SDS a následně byla změřena koncentrace proteinů pomocí Protein assay kit (Bio-Rad). Vzorek byl naředěn na koncentraci 1 mg/ml, přičemž objem u studovaného proteinu i u kontroly byl stejný. Ke vzorku byl přidán DSP ve zvolené koncentraci a proběhla hodinová inkubace na ledu. Reakce byla zastavena přidáním 50mM Tris (pH 7,4) a inkubací 15 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl stočen při 30 000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl uchován jako kontrola A1, ze supernatantu bylo odebráno 200 µl jako A2. Zbytek supernatantu byl zředěn 10x v inkubačním pufru s inhibitory proteáz. Odebraných 200 µl bylo uchováno jako alikvót A3.

Inkubační pufr:

- 50mM Tris (Sigma)
- 150mM NaCl (Sigma)
- 5mM EDTA (Sigma)
- 1% Triton (Sigma)
- pH 7,4

4.14.3 Izolace pomocí Dynabeads

Kuličky Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen) byly promyty na rotátoru v inkubačním pufru v poměru 20 µl kuliček na 1 ml pufru po dobu 5 minut celkem třikrát. Kuličky byly poté smíchány se získaným supernatantem (viz 4.14.2) a inkubovány hodinu na rotátoru při pokojové teplotě a poté přes noc na rotátoru ve 4 °C.

Vzorek byl pro oddělování magnetických kuliček od supernatantu v průběhu pokusu vkládán do magnetického stojánu. Nejprve bylo ze supernatantu bez kuliček bylo odebráno 200 µl jako alikvót A4 a zbytek byl odstraněn. Kuličky s navázaným proteinem byly promyty inkubačním pufrům s 0,1% SDC a přidáními inhibitory proteáz 3x po dobu 5 minut. Poté byly promyty 5 minut ve 100 µl boiling pufru bez SDS. Všechny 100 µl supernatantu bez kuliček bylo uchováno jako A5. Následovalo promytí kuliček 5 minut ve 100 µl vzorkového pufru bez merkaptóetanolu a bromfenolové modři a všechny supernatant bez kuliček byl opět uchován, tentokrát jako A6. Nakonec byly kuličky promyty 2x 5 minut v 700 µl 100mM triethylamonium bikarbonátu (TEAB; Sigma) a po druhém promytí bylo odebráno 100 µl vzorku obsahujícího kuličky a uchováno jako A7. K A7 bylo přidáno 20 µl 1x koncentrovaného vzorkového pufru a 5 µl biotinu ve finální koncentraci 100 µM a vzorek byl inkubován 5 minut při 95 °C. Ze zbylého původního vzorku (před odběrem A7) byl odstraněn pufr a suché přichystané kuličky byly skladovány v -20 °C. Vzorky A0 – A6 byly inkubovány v 5x koncentrovaném vzorkovém pufru při 95 °C po dobu 5 minut. Všechny vzorky (A0-A7) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a western blotu. Kuličky s navázanými proteiny byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Boiling pufr:

- 50mM Tris
- 1mM EDTA
- 1% SDS
- pH 7,4

SDS-PAGE vzorkový pufr (bez merkaptetanolu a bromfenolové modři):

- 60mM Tris
- 2% SDC
- 10% glycerol

4.14.4 Izolace proteinu bez chemického crosslinkeru

Kultura *G. intestinalis* byla napěstována v objemu 100 ml. Buňky byly zality ledovým PBS a chlazeny na ledu do uvolnění buněk ze stěny lahve. Následně byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1200 x g a 4 °C. Pelet byl resuspendován v 500 µl PBS s inhibitory proteáz a 20 µl bylo odebráno jako alikvót A0. Ze vzorku bylo odebráno 10 µl, zlyzováno 1% SDS a pomocí Protein assay kit (Bio-Rad) byla změřena koncentrace proteinů. Původní resuspendovaný pelet byl poté naředěn na koncentraci proteinu 1 mg/ml.

Roztok byl centrifugován při 30 000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v boiling pufru zpět na koncentraci proteinu 1 mg/ml a inkubován 10 minut při 80 °C. Poté byl vzorek opět centrifugován za stejných podmínek. Pelet byl uchován jako kontrola A1, 50 µl supernatantu jako alikvót A2. Zbýlý supernatant byl naředěn 10x inkubačním pufrům s inhibitory proteáz. Z tohoto vzorku bylo 50 µl uchováno jako alikvót A3.

Dynabeads byly promyty stejným způsobem jako je popsán v kapitole 4.14.3. Pro tuto analýzu jich bylo použito pouze 5 µl. Po smíchání kuliček se supernatantem byl vzorek inkubován hodinu při pokojové teplotě na rotátoru a posléze přes noc ve 4 °C. Po noční inkubaci byly vzorky vloženy do magnetického stojánu a byl odebrán alikvót A4. Kuličky byly promyty 3x 5 minut v 700 µl inkubačního pufru s 0,1% SDC a inhibitory proteáz. Poté byly promyty 1x 5 minut ve 100 µl boiling pufru bez SDS. Všechny roztoky bez kuliček byly uchovány jako alikvót A5. Následovalo promytí kuliček 1x 5 minut ve 100 µl SDS-PAGE vzorkovém pufru bez merkaptetanolu a bromfenolové modři. Všechny 100 µl bez kuliček bylo uchováno jako A6. Vzorek byl poté promyt 2x 5 minut v 700 µl 100mM TEAB. Po druhém promytí byly veškeré kuličky zachyceny na magnetickém stojánu, resuspendovány ve 20 µl 1x vzorkovém pufru se 100µM biotinem. K alikvótům A0-A6 byl přidán 1x vzorkový pufr a všechny vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 10 minut. Výsledek byl analyzován pomocí western blotu.

4.14.5 Izolace proteinu s použitím redukčního činidla

Kultura buněk *G. intestinalis* narostlá v objemu 100 ml byla zalita ledovým PBS a chlazená na ledu do uvolnění buněk ze stěny lahve. Po centrifugaci při 1200 x g a 4 °C po dobu 10 minut byly buňky resuspendovány v 0,5 ml PBS s inhibitory proteáz. Ze vzorku bylo odebráno 20 µl jako alikvót A0. Následně bylo 10 µl zlyzováno pomocí 1% SDS a v tomto vzorku byla změřena koncentrace proteinů pomocí Protein assay kit (Bio-Rad). Původní kultura byla poté naředěna na koncentraci proteinu 1 mg/ml. Poté byly buňky centrifugovány při 30 000 x g a 4 °C po dobu

10 minut. Následně byla provedena postupná denaturace. Pelet byl resuspendován v boiling pufru bez SDS s přidáním 100mM dithiotreitem (DTT) na koncentraci proteinu 1 mg/ml a inkubován při 80 °C po dobu 10 minut. Vzorek byl centrifugován při 30 000 x g a 4 °C po dobu 10 minut a pelet byl resuspendován v boiling pufru s 1% SDS a 100mM DTT. Poté byl vzorek opět inkubován při 80 °C po dobu 10 minut. Po další centrifugaci za stejných podmínek byl pelet uchován jako kontrolní alikvót A1 a ze supernatantu bylo odebráno 50 µl jako alikvót A2. Supernatant byl ředěn 10x v inkubačním pufru s přidáním blokátory proteáz a 100mM DTT. Z naředěného supernatantu bylo odebráno 50 µl jako alikvót A3.

Dynabeads s navázaným streptavidinem byly promyty dle protokolu v kapitole 4.14.3. Pro tento pokus bylo použito 5 µl kuliček. Promyté kuličky byly smíchány s ředěným supernatantem a inkubovány hodinu na rotátoru při pokojové teplotě a následně přes noc při 4 °C. Po inkubaci byly kuličky izolovány pomocí magnetického stojánu a ze supernatantu bylo odebráno 50 µl jako alikvót A4. Kuličky byly poté promývány, nejprve 3x 5 minut v inkubačním pufru s 0,1% SDC, 100mM DTT a blokátory proteáz, poté 1x 5 minut v boiling pufru bez SDS se 100mM DTT a blokátory proteáz. Po oddělení kuliček byl boiling pufr uchován jako A5. Následovalo promytí 1x 5 minut ve 100 µl SDS-PAGE vzorkovém pufru bez merkaptetanolu a bromfenolové modři s přidáním 100mM DTT a blokátory proteáz. Všechny supernatant bez kuliček byl uchován jako A6. Nakonec byly kuličky promyty 2x 5 minut v 700 µl TEAB se 100mM DTT. Oddělené kuličky byly resuspendovány ve 20 µl 1x vzorkovém pufru se 100µM biotinem a 100mM DTT. K alikvótům A0-A6 byl přidán vzorkový pufr. Všechny vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 10 minut. Výsledek byl analyzován pomocí metody western blot.

Protože se tímto protokolem podařilo navázat studovaný protein na Dynabeads, byl všechny zbylý vzorek A7 bez kuliček separován na 0,75mm 12% akrylamidovém rozdělovacím gelu s 5% zaostřovacím gelem. Gel byl poté barven pomocí roztoku Coomassie (viz kapitola 4.9). Po odbarvení byl gel analyzován hmotnostní spektrometrií.

4.14.5.1 Analýza mobility v SDS-PAGE

Pro ověření podmínek vzniku přibližně 70kDa bandu pozorovaného při izolaci proteinu DIC6939 s redukčním činidlem byl navržen pokus se třemi způsoby denaturace. Všechny vzorky obsahovaly živé buňky *G. intestinalis* exprimující protein DIC6939 a BirA. Narostlé kultury byly centrifugovány při 1200 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Vzorek A byl připraven resuspendováním peletu v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru a inkubováním 10 minut při teplotě 95 °C. Pelet vzorku B byl resuspendován v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru s přidáním 100mM DTT a inkubován 10 minut při teplotě 95 °C. Vzorek C byl připraven jako při izolaci popsané v kapitole 4.14.5. Pelet buněk byl resuspendován v boiling pufru s přidáním 100mM DTT a inkubován při teplotě 80 °C po dobu 10 minut. Následně byl centrifugován 10 minut při 30 000 x g. Pelet byl resuspendován v boiling pufru s 1% SDS a 100mM DTT a inkubován 10 minut při teplotě 80 °C. Poté byl v 5x konc. vzorkovém pufru s přidáním 100mM DTT inkubován 10 minut při 95 °C. Výsledek pokusu byl detekován pomocí metody western blot.

4.14.6 Modrá nativní elektroforéza

Modrou nativní elektroforézou byla analyzována buňky *G. intestinalis* exprimující protein GL50803_6939-BAP a cytosolickou BirA-HA. Pomocí Protein assay kit (Bio-Rad) byla změřena koncentrace proteinů ve vzorku. Následně byly namíchány tři reakce s rozdílnými koncentracemi digitoninu (0,5%, 1% a 2%). Složení reakcí je uvedeno v tabulce 9. Vzhledem k nízké koncentraci proteinu byl použit maximální možný objem buněčného lyzátu.

Tabulka 9: Složení reakcí modré nativní elektroforézy.

Koncentrace digitoninu	0,5%	1%	2%
Lyzát (μl)	10	10	10
10% digitonin (μl)	1	2	4
4x NativePAGE Sample buffer (μl)	5	5	5
H ₂ O (μl)	4	3	1

Namíchané vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 15 minut a centrifugovány 30 minut při 20 000 x g a 4 °C. Ze supernatantu stočeného vzorku bylo 18 μl smícháno s NativePAGE™ 5% G-250 Sample Additive (Invitrogen) tak, aby objem aditiva odpovídal čtvrtině objemu detergentu a vzorky byly doplněny vodou do celkového objemu 20 μl.

Horní komora sestavené elektroforetické aparatury byla naplněna 1x NativePAGE™ tmavým katodovým pufrém. Vzorky a standard NativeMARK™ (Invitrogen) byly nanášeny do gelu NativePAGE 3-12% Bis-Tris (Novex) v objemu 10 μl. Dolní komora byla plněna anodovým pufrém. Po vcestování vzorků do třetiny gelu byl tmavý katodový pufr nahrazen světlým katodovým pufrém. Elektroforéza běžela s postupným zvyšováním napětí z 50 V na 150 V za stálého chlazení (4 °C) až do doputování čela k dolnímu okraji gelu.

Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a vizualizovány pomocí králičí α-BAP protilátky a sekundární proti-králičí protilátky s navázanou křenovou peroxidázou.

Anodový pufr:

- 30 ml 20x NativePAGE Running buffer (Novex)
- 570 ml dH₂O

Tmavý katodový pufr

- 10 ml 20x NativePAGE Running buffer (Novex)
- 10 ml 20x NativePAGE Cathode buffer additive (Novex)
- 180 ml dH₂O

Světlý katodový pufr

- 10 ml 20x NativePAGE Running buffer (Novex)
- 1 ml 20x NativePAGE Cathode buffer additive (Novex)
- 189 ml dH₂O

5 Výsledky

5.1 Bioinformatická analýza interaktomu proteinů vnější mitosomální membrány

Přípravou pro laboratorní práci byla bioinformatická analýza proteinů získaných izolací s proteiny vnější mitosomální membrány *GiTom40* a *GiMOMP35* (Martincová et al., 2015). K *in silico* charakterizaci proteinů byly použity nástroje uvedené v kapitole 4.2. Proteiny nacházející se v obou datasetech (celkem 7) a protein GL50803_17276 byly z analýzy vynechány, neboť je již studovali Martincová a kolektiv. Celkem bylo analyzováno 40 proteinů rozdělených do dvou tabulek dle svého zdrojového proteinu – Tom40 (tabulka 10) a MOMP35 (tabulka 11).

Mezi oběma proteinovými datasety byl patrný výrazný rozdíl, přestože spolu podle dostupných publikací Tom40 a MOMP35 pravděpodobně interagují (Rout et al., 2016). Zatímco velká část proteinů (71,4 %) spadajících do interaktomu Tom40 měla alespoň jeden transmembránový helix, z proteinů patřících do datasetu MOMP35 predikce popsala transmembránový helix pouze u jediného. Signální peptid, naznačující možnou lokalizaci proteinu do ER, a tedy protein, který by se mohl podílet na interakci mitosomu s ER měly pouze proteiny v datasetu Tom40 (23,8 %). Anotace byly získány z databáze GiardiaDB. Proteiny neznámé funkce tvořily výraznou skupinu v obou datasetech – 42,8 % u Tom40 a 89,5 % u MOMP35. Pro zařazení do proteinových rodin posloužila databáze Pfam. Zařazení se podařilo u přibližně poloviny proteinů datasetu Tom40 a pouze u dvou z datasetu MOMP35. Dalším krokem byly predikce homologních proteinů pomocí programů BlastP a HHPred. Ve většině případů byly predikce stejné či velmi podobné.

Zakončením bioinformatické analýzy byla volba proteinů pro laboratorní práci. Zvoleno bylo šest proteinů z datasetu Tom40 (tabulka 10, zelená). Mezi vybranými proteiny byly 4 s velkým množstvím transmembránových helixů (9 - 12), z nichž tři byly potenciální membránové transportéry (GL50803_91712, GL50803_96818 a GL50803_31295) a čtvrtým byla predikovaná glykosyltransferáza (GL50803_137685). Dalším byl protein neznámé funkce s GLUG motivem GL50803_114210, u něhož byl identifikován jeden transmembránový helix a který byl vybrán kvůli předchozím nálezům v izolacích prováděných v naší laboratoři. Posledním z vybraných je GL50803_6939, automaticky anotovaný jako střední řetězec dyneinu, u něhož nás zajímalo, zda by se mohl podílet na transportu mitosomů.

Tabulka 10: Proteiny izolované s mitosomálním proteinem Tom40. Pomocí TMHMM byly vyhledávány transmembránové helixy (TH). Pro vyhledání signálních peptidů byl použit program SignalP 4.1. Anotace byly vyhledány v databázi GiardiaDB. Pfam sloužil k identifikaci známých proteinových rodin. Programy BlastP a HHPred posloužily k vyhledání homologních proteinů. Zeleně jsou označeny proteiny vybrané pro laboratorní práci.

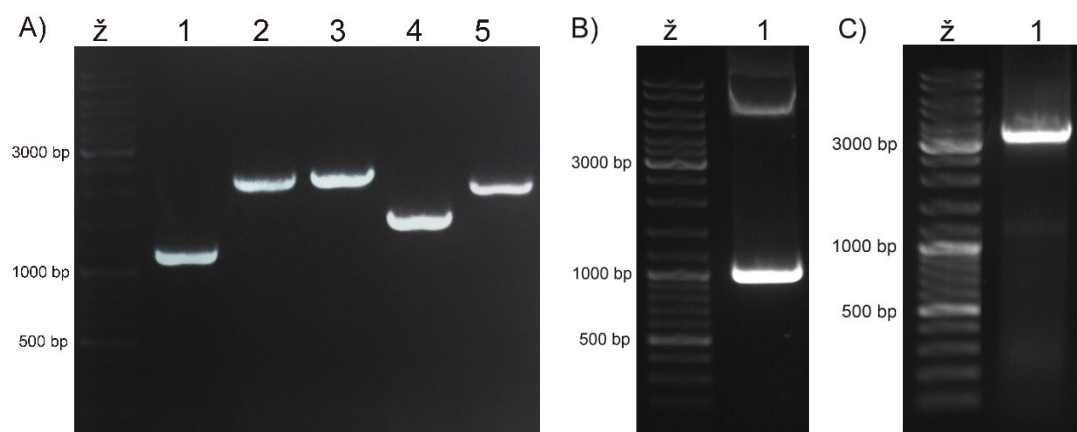
Protein	TH	Signální peptid	Anotace	Pfam	BlastP	HHPred
GL50803_13922	1	ano	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce, proteiny s GLUG motivem	Domnělá proteáza IgA1
GL50803_114210	1	ano	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce, proteiny s GLUG motivem	Protein s GLUG motivem
GL50803_8152	-	ne	NEK Kináza	Kinázová doména, Ankyrinové repetice	NEK Kináza, Ankyrinové repetice	Kináza
GL50803_14297	1	ne	VSP	VSP	VSP	VSP <i>G. intestinalis</i>
GL50803_91712	11	ne	Rodina aminokyselinových transportérů	Transmembránový aminokyselinový transportér	Rodina aminokyselinových transportérů	Aminokyselinový antiportér
GL50803_137685	9	ano	Protein neznámé funkce	Oligosacharyl transferáza, STT3 podjednotka	Oligosacharyl transferáza, STT3 podjednotka	Transmembránová oligosacharyl transferáza
GL50803_96818	11	ne	Protein neznámé funkce	Nukleosidový transportér	Nukleosidový transportér	Podobnost s transportérem G-bakterie
GL50803_14469	2	ne	Synaptobrevin-like protein	Synaptobrevin	Synaptobrevininu podobný protein	Podobnost s lidským Sec23; homolog synaptobrevinu
GL50803_33674	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Proteiny neznámé funkce
GL50803_6939	-	ne	Střední řetězec dyneinu	Beze shody	Střední řetězec dyneinu	Střední řetězec dyneinu
GL50803_31295	12	ne	DinF	Beze shody	DinF, Transportér, Sodno-draselná pumpa	MATE, transportní protein (bakteriální)
GL50803_7242	3	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Proteiny neznámé funkce
GL50803_21505	-	ne	Protein 21.1	Ankyrinové repetice	NEK kináza, Protein s ankyrinovými repeticemi	Ankyrinové repetice
GL50803_40224	6	ne	Protein podobný MDR	Beze shody	Protein podobný MDR, Transportér z rodiny MFS	Transportér; Protein podobný MDR
GL50803_9529	4	ne	Protein se zinkovým prstem	DHHC palmitoyltransferáza	Doména zinkového prstu, DHHC	Palmitoyltransferáza, Doména zinkového prstu
GL50803_15104	1	ne	Sec1, domnělý	Sec1 rodina	Sec1, domnělý	Sec1
GL50803_16679	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_16957	-	ne	Protein s WD40 doménami	WD domény, G-beta repetice	Rodina proteinů s WD40 repeticemi; autofágní protein	Protein s WD40 repeticemi
GL50803_8471	1	ano	Gp49, domnělý	Beze shody	Gp49	Nesignifikantní
GL50803_86468	1	ano	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_12945	5	ne	Protein neznámé funkce	Yip1 doména	Protein neznámé funkce, Protein obsahující Yip1 doménu	Nesignifikantní

Tabulka 11: Proteiny izolované s mitosomálním proteinem MOMP35. Popis odpovídá tabulce 10.

Protein	TH	Signální peptid	Anotace	Pfam	BlastP	HHPred
GL50803_14818	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_16926	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_16985	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_14198	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_29796	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_16981	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_8623	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_8460	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Homolog GCN4 (kvas.)
GL50803_2822	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_3957	-	ne	NEK Kináza	Kináza, ankyrinové repetice	NEK kináza	Kináza
GL50803_4590	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_12224	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_8955	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_7778	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_10452	1	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_17312	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_6007	-	ne	Protein 21.1	Ankyrinové repetice	Protein 21.1	Ankyrinové repetice
GL50803_17484	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní
GL50803_7348	-	ne	Protein neznámé funkce	Beze shody	Proteiny neznámé funkce	Nesignifikantní

5.2 Příprava plasmidů pro expresi v *G. intestinalis*

Prvním krokem experimentální práce byla příprava rekombinantních plasmidů pro transfekci buněk *G. intestinalis*. Geny pro vybrané proteiny byly amplifikovány z genomové DNA *G. intestinalis* pomocí PCR. Standardním protokolem se podařilo napoprvé amplifikovat geny pro GL50803_91712, GL50803_137685, GL50803_96818 a GL50803_6939 (obrázek 7 A). Gen pro cytosolickou BirA byl amplifikován z již připraveného plasmidu (obrázek 7 B). Gen pro GL50803_31285 se zdařilo amplifikovat po přidání enhanceru. Gen pro GL50803_114210 se i po opakované optimalizaci protokolu nepovedlo amplifikovat ve správné délce. Kontrola sekvence odhalila ve střední části genu 11 bp dlouhý úsek komplementární k používanému reverznímu primeru. Po navržení dlouhého, více specifického primeru bylo možné sekvenci amplifikovat standardním protokolem s použitím enhanceru (obrázek 7 C).



Obrázek 7: Amplifikace vybraných genů – horizontální gelová elektroforéza. Na obrázku A) lze vidět amplifikované geny správné velikosti pro GL50803_91712 (2), GL50803_137685 (3), GL50803_96818 (4) a GL50803_6939 (5). Gen pro GL50803_114210 v nesprávné velikosti je zobrazen pod číslem 1 a ve správné velikosti pod stejným číslem na obrázku C). Obrázek B) zobrazuje amplifikovaný gen pro BirA, žebřík.

Všechny geny vyjma genu pro GL50803_114210 se podařilo zaklonovat do vybraných plasmidů (kapitola 4.3). Kvůli opakovaným problémům s klonováním GL50803_114210 jsme se v této fázi rozhodli gen z další práce vynechat. U všech genů byla správnost klonování ověřena kontrolní restrikcí a sekvenací.

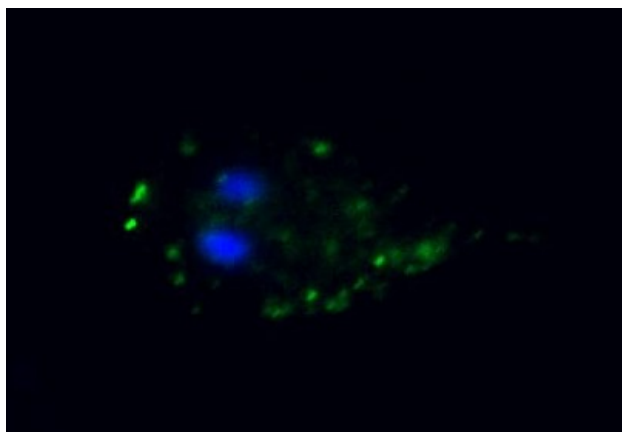
5.3 Dvojitá transfekce *G. intestinalis* a ověření exprese

Plasmidy s vloženými giardiovými proteiny fúzovanými s BAP tagem byly transfekovány do trofozoitů *G. intestinalis* kmene WB (kapitola 4.8). Pravděpodobně kvůli přítomnosti silného promotoru měla transfekce nízkou úspěšnost a musela být několikrát opakována. Po zavedení stabilních linií selektovaných antibiotiky bylo možné provést druhou transfekci plasmidem pUC57-mini nesoucím BirA.

Po ustálení dvojité transfekovaných linií bylo možné ověřit expresi pomocí metody western blot a fluorescenční mikroskopie, která zároveň posloužila k charakterizaci lokalizace proteinu v buňce. Dvojitá transfekce umožnila vizualizaci jak α -BAP protilátkou, tak Streptavidinem s navázanou Alexou 488 (Str488) díky přítomnosti BirA, biotinylojící BAP značku. V případě neprůkaznosti western blotu s buněčným lyzátem byly buňky frakcionovány a exprese byla ověřována paralelně ve frakcích HSP, CYT i v lyzátu. Frakcionace umožní zakoncentrování vzorku, a tedy lepší vizualizaci proteinu.

5.3.1 Protein GL50803_91712

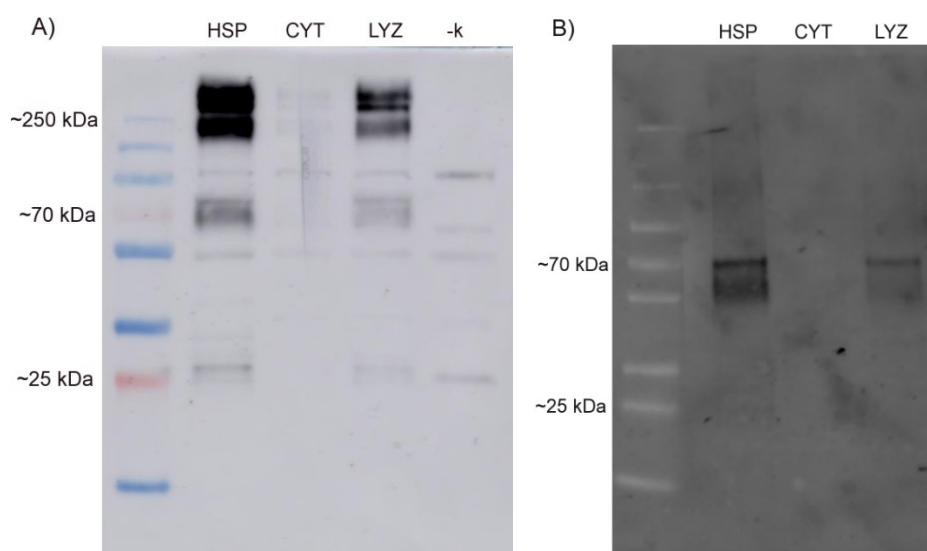
U proteinu GL50803_91712 se ani po opakované transfekci nepodařilo zavést stabilní linii, u níž by se povedlo zřetelně prokázat expresi proteinu. Ačkoliv bylo možné na preparátech pozorovat fluorescenční signál (obrázek 8), nebylo možné ho přiřadit k žádné typické lokalizaci v buňce *G. intestinalis*, byl tedy považován za nespecifický. Zároveň western blot lyzátu ani frakcí neodhalil band o správné velikosti.



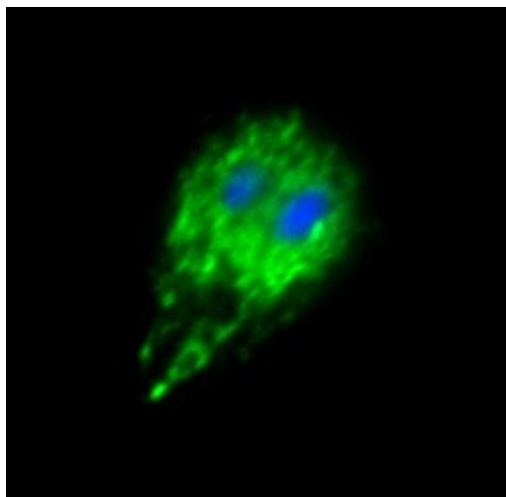
Obrázek 8: Fluorescenční mikroskopie proteinu GL50803_91712. Modře jsou značena jádra pomocí DAPI. Sekundární protilátka s Alexa Fluor 488 je navázána na králičí α -BAP, měla by tedy značit protein GL50803_91712, kvůli absenci exprese proteinu je ale signál pravděpodobně nespecifický. Zvětšeno 1000x.

5.3.2 Protein GL50803_137685

Bioinformatická analýza ukázala, že protein GL50803_137685 má signální presekvenční, byla tedy předpokládána lokalizace do ER. Tu spolehlivě potvrdila také fluorescenční mikroskopie (obrázek 10). Na imunoblotu byly opakovaně pozorovány bandy o velikosti 250 kDa a více, a to i v rozličných liniích z rozdílných transfekcí (obrázek 9 A). Naopak bandy o správné velikosti byly buď velmi slabé nebo nepřítomné. Vysvětlením může být fakt, že jde o transmembránový protein s 11 transmembránovými helixy, které může být obtížné solubilizovat. Že jde o protein vázaný s membránou dokazují i frakce, kde je protein vidět v lyzátu a membránové frakci, ale nikoli v cytoplasmě. Při ověření biotinylace pomocí Str488 byl v lyzátu a membránové frakci pozorován band o správné velikosti (Obrázek 9 B).



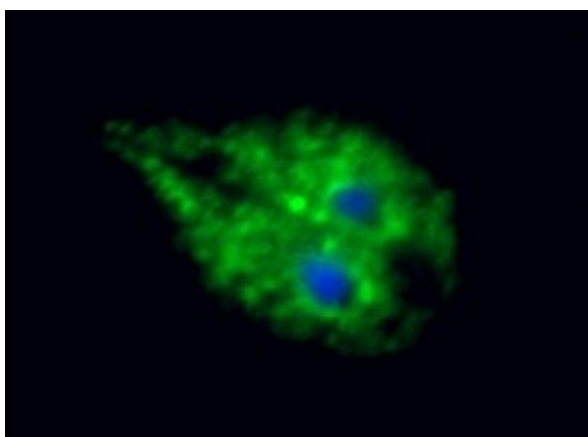
Obrázek 9: Ověření exprese proteinu GL50803_137685 pomocí imunoblotu. Na obrázku A) lze vidět buněčné frakce značené primární protilátkou králičí α -BAP a negativní kontrolu, ve které jsou vidět nespecifické bandy. Bandy o velikosti ~250 kDa v HSP a LYZ jsou pravděpodobně nerozpuštěné komplexy. Obrázek B) je značen Str488 a zobrazuje bandy o správné velikosti v HSP a LYZ. Velké bandy nejsou vidět, pravděpodobně kvůli absenci biotinylace uvnitř sbaleného komplexu.



Obrázek 10: Ověření exprese a lokalizace proteinu GL50803_137685 pomocí nepřímé fluorescence. Jádra jsou značena modře pomocí DAPI. Protein GL50803_137685, který vykazuje typickou cisternovou ER lokalizaci je značen zeleně pomocí primární králičí α -BAP protilátky a sekundární protilátky fúzované s Alexou 488. Zvětšeno 1000x.

5.3.3 Protein GL50803_96818

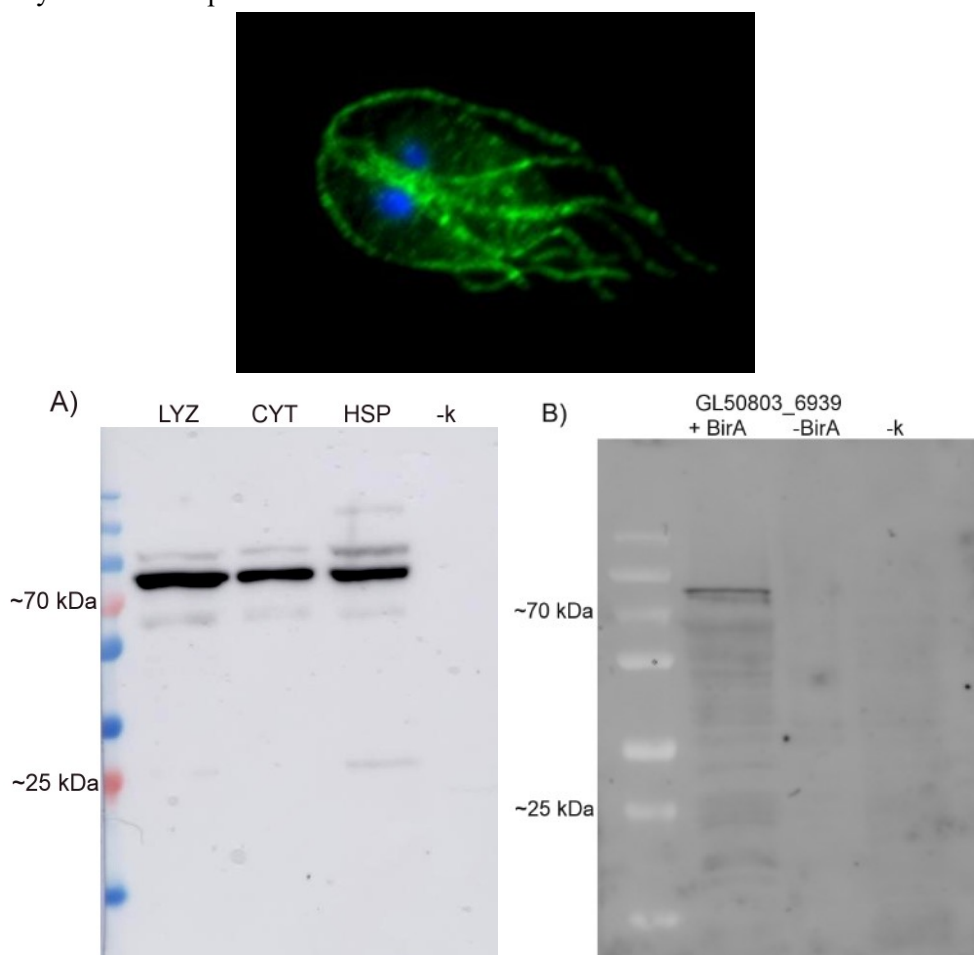
Expresi proteinu GL50803_96818 se od počátku jevila jako velmi obtížná. Z mnoha opakovaných transfekcí se podařilo pouze u jedné linie dosáhnout stabilního nárůstu, načež se po dvou očkováních buňky přestaly množit a linie vymřela. Vymražené kryostabiláty nebyly životaschopné. Bylo proto konstatováno, že overexpresi tohoto proteinu má letální fenotyp. Protein na fluorescenčním preparátu vykazoval lokalizaci odpovídající ER, ovšem v neobvyklém „bodovém“ provedení (obrázek 11). Expresi se nepodařilo ověřit pomocí western blotu.



Obrázek 11: Ověření exprese a lokalizace proteinu GL50803_96818 pomocí nepřímé fluorescence. Jádra jsou značena modře pomocí DAPI, protein GL50803_96818 zeleně pomocí primární králičí α -BAP protilátky a sekundární protilátky fúzované s Alexou 488. Zvětšeno 1000x.

5.3.4 Protein GL50803_6939

Protein GL50803_6939 je v databázi GiardiaDB anotován jako střední řetězec dyneinu, jeho lokalizace byla proto předpokládána v oblasti bičků a buněčných mikrotubulů. To se imunofluorescencí potvrdilo, bylo možné zřetelně pozorovat struktury odpovídající bičkům (obrázek 12). Imunoblotem se podařilo vizualizovat specifické bandy jak při detekci protilátkou α -BAP (obrázek 12 A), tak při použití Str488 (obrázek 12 B). Zároveň byly při detekci pomocí Str488 značeny buněčné linie exprimující BirA a postrádající BirA. Zatímco v linii exprimující BirA byl jasně znatelný band odpovídající velikosti bandu na membráně značené pomocí α -BAP, v linii postrádající BirA žádný biotinylovaný protein detekován nebyl. Přítomnost v obou buněčných frakcích může znamenat, že část proteinu v buňce je pevně vázána v sedimentující frakci a část je volně v cytosolu (k uvolnění může dojít při přípravě frakcí). Molekulová hmotnost zkoumaného proteinu by ovšem podle bioinformatických dat měla odpovídat 70 kDa, přičemž na membránách bych detekován protein zdánlivě větší. Ověření specifity bude v další práci adresováno.

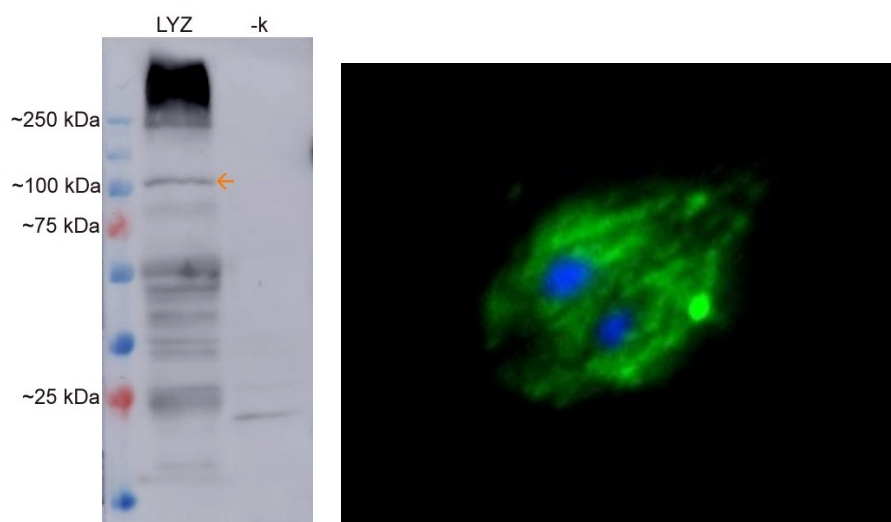


Obrázek 12: Ověření exprese proteinu GL50803_6939 pomocí imunofluorescence a western blotu.

Na mikroskopickém snímku lze vidět modrá jádra značená DAPI a zkoumaný protein značený zeleně α -BAP protilátkou a sekundární protilátkou fúzovanou s Alexou 488. Zvětšeno 1000x. Na obrázku A) lze vidět lyzát a obě buněčné frakce značené pomocí primární králičí α -BAP protilátky a negativní kontrolu -k. Protein GL50803_6939 se nachází ve všech frakcích. Na obrázku B) značeném pomocí Str488 lze vidět zkoumaný protein detekovaný v buňkách exprimujících BirA (+BirA), v buňkách bez BirA (-BirA) a negativní kontrolu. Zkoumaný protein je při použití tohoto způsobu detekce vidět pouze v buněčné linii exprimující BirA, což dokazuje, že u proteinu dochází k biotinylování BAP značky tímto enzymem.

5.3.5 Protein GL50803_31295

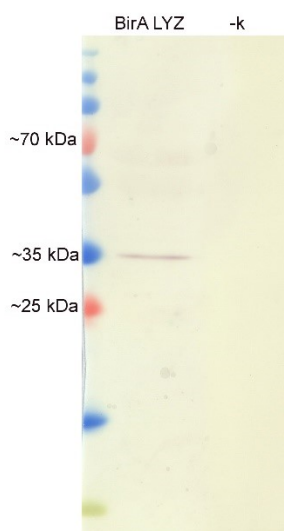
Protein GL50803_31295 měl ze všech studovaných predikovaných nejvíce transmembránových helixů (12). Na western blotu bylo opět možné pozorovat výrazný band o velikosti přes 250 kDa, jehož přítomnost by mohla být způsobena právě existencí špatně solubilizovatelného komplexu. Při použití silného substrátu se kromě pozadí ukázal také band, který by mohl odpovídat studovanému proteinu (obrázek 13). Tento band se ovšem nepodařilo vizualizovat pomocí Str488. Nelze s jistotou říct, zda je band nespecifický, či zda pouze nedochází k jeho biotinylationi. Na fluorescenčních preparátech bylo možné pozorovat lokalizaci odpovídající ER.



Obrázek 13: Ověření exprese proteinu GL50803_31295 pomocí western blotu a imuno fluorescenčního preparátu. Na membráně značené primární králičí α -BAP protilátkou lze vidět velký komplex, který může být způsoben nedostatečnou solubilizací, či může souviset s topologií proteinu, který je transmembránový s dvanácti predikovanými helixy. Kolem velikosti ~100 kDa (oranžová šipka) lze vidět band, který by mohl odpovídat zkoumanému proteinu, putující gelem pomaleji než standard. Specifita ovšem nebyla ověřena. Na fluorescenčním snímku jsou jádra značena modře pomocí DAPI a zkoumaný protein primární králičí α -BAP protilátkou a sekundární protilátkou fúzanou s Alexou 488. Protein GL50803_31295 vykazuje lokalizaci do ER. Zvětšeno 1000x.

5.3.6 BirA

Buněčnou linii exprimující pouze cytosolickou BirA bylo třeba vytvořit jako negativní kontrolu pro plánované izolace. Pomocí western blotu byl vizualizován band o správné velikosti (obrázek 14). Přestože je exprese poměrně slabá, její dostatečnost dokazuje biotinylace zkoumaných proteinů (např. 5.4.3).



Obrázek 14: Cytosolická BirA exprimovaná v buňkách *G. intestinalis*. Western blot je značen pomocí myší α -V5 protilátky a sekundární protilátky s navázanou alkalickou fosfatázou. Na blotu lze vidět lyzát buněk exprimujících BirA a negativní kontrolu -k.

5.3.7 Výběr vhodného kandidáta pro další práci

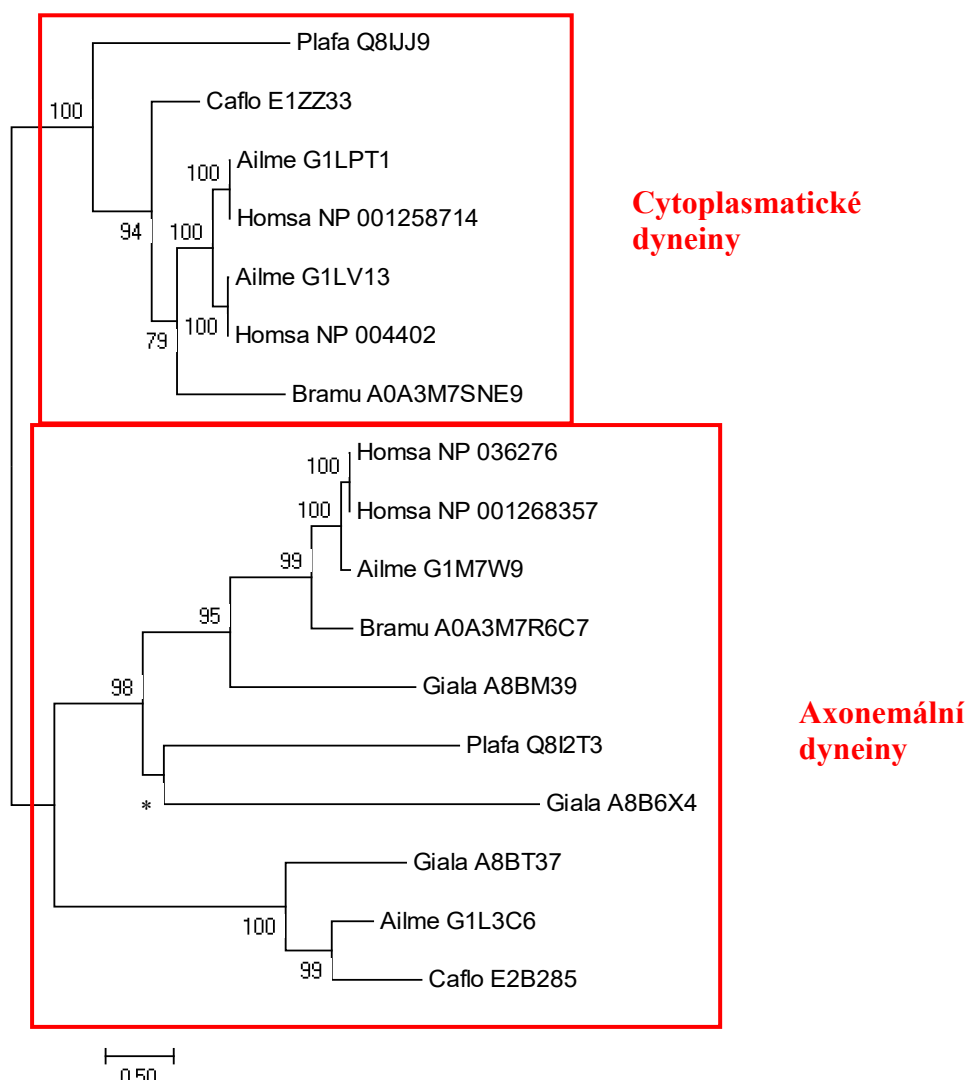
Pro další laboratorní charakterizaci byl vybrán protein GL50803_6939 dále označovaný jako DIC6939 (střední řetězec dyneinu, dynein intermediate chain). Splňoval požadavky na protein silně exprimovaný, dobře detekovatelný na blotu, ale neovlivňující negativně životaschopnost buněk. Zároveň byla úspěšně detekována jeho biotinylace pomocí Str488.

Tento protein byl zajímavý také z důvodů vyplývajících z informací uvedených v kapitole 2.2.1. Protože v živočišných buňkách je běžně transport mitochondrií zajišťován mimojiné cytoplasmatickými dyneiny, položili jsme si otázku, zda se může tento protein podílet na transportu mitosomů v buňkách *G. intestinalis*.

5.4 Charakterizace DIC6939 *in silico*

Prvním krokem k charakterizaci proteinu DIC6939 byla jeho podrobnější charakterizace *in silico*. Jak je uvedeno v tabulce 10, programy BlastP i HHPred identifikovaly tento protein jako střední řetězec dyneinu. Podle databáze UniProt Knowledgebase (UniProt Consortium, 2018), kde lze protein najít pod identifikátorem A8BT37, odhalilo, že jde o nerevidovanou automatickou anotaci. Anotační skóre je 1 bod z 5, což značí, že k anotaci není uvedena literatura s experimentálními důkazy. V UniProt databázi jsou taktéž prezentovány předběžné predikce funkce proteinu dle projektu Gene Ontology (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium, 2019). Dle těchto predikcí má DIC6939 schopnost vázat těžký řetězec dyneinu a lehký řetězec dyneinu. Má podíl na biologických procesech zahrnujících pohyb bičíku, pohyb po mikrotubulárních strukturách a sestavení vnějšího raménka axonemálního dyneinu. Predikovaná buněčná lokalizace je vnější raménko dyneinového komplexu. Tyto informace naznačují, že identifikovaný střední řetězec dyneinu je spíše součástí axonemálních dyneinových komplexů.

K bližší charakterizaci vztahu studovaného proteinu k axonemálním či cytoplasmatickým dyneinům posloužila fylogenetická analýza metodou „maximum likelihood“. Morrison et al., 2007 ve své práci spekuluje o úplné absenci cytoplasmatických dyneinů v buňce *G. intestinalis* (viz. kapitola 2.2). Do této fylogenetické analýzy byly proto vloženy sekvence všech tří doposud identifikovaných potenciálních středních řetězců dyneinu (GL50803_6939, GL50803_33218 a GL50803_10254), u nichž bylo cílem zařadit je mezi axonemální nebo cytoplasmatické dyneiny na základě podobnosti sekvencí se známými proteiny. Z vybraných středních řetězců axonemálních a cytoplasmatických dyneinů (uvedených v kapitole 4.2) byl vytvořen alignment programem ClustalW v softwaru MEGA 7.0. Následně byla provedena fylogenetická analýza pomocí programu PhyML (substitučním modelem LG) a byl vygenerován fylogenetický strom s uvedenou statistickou podporou větví (bootstrap 100; obrázek 15). Na obrázku lze vidět zřetelné rozdělení středních řetězců dyneinů do dvou skupin. Všechny tři sekvence dyneinů patřících *G. intestinalis* (Giala A8BT37 = DIC6939, A8BM39 a A8B6X4) spadají do skupiny axonemálních dyneinů.

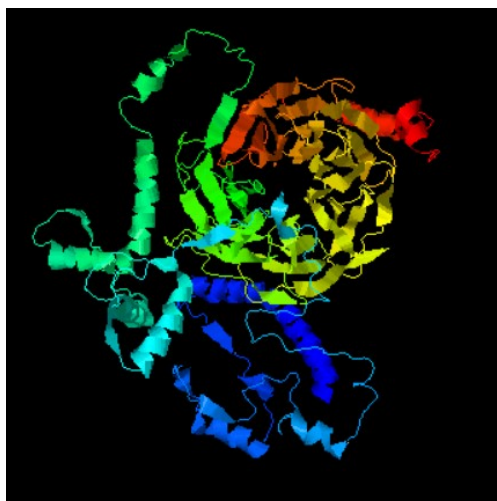


Obrázek 15: Fylogenetická analýza metodou „maximum likelihood“, zařazující střední řetězce dyneinu *G. intestinalis* do skupin axonemálních/cytoplasmatických dyneinů. Analýza byla provedena programem PhyML. Červené rámečky ohraničují dané skupiny dyneinů. Všechny tři sekvence dyneinů *G. intestinalis* spadají do axonemálních dyneinů. Ailme, *Ailuropoda melanoleuca*; Bramu, *Brachionus muelleri*; Caflo, *Camponotus floridanus*; Giala, *Giardia intestinalis*; Homsa, *Homo sapiens*; Plafa, *Plasmodium falciparum*. Číslo za zkratkou je přístupové číslo v databázi UniProt/NCBI (viz. 4.2).

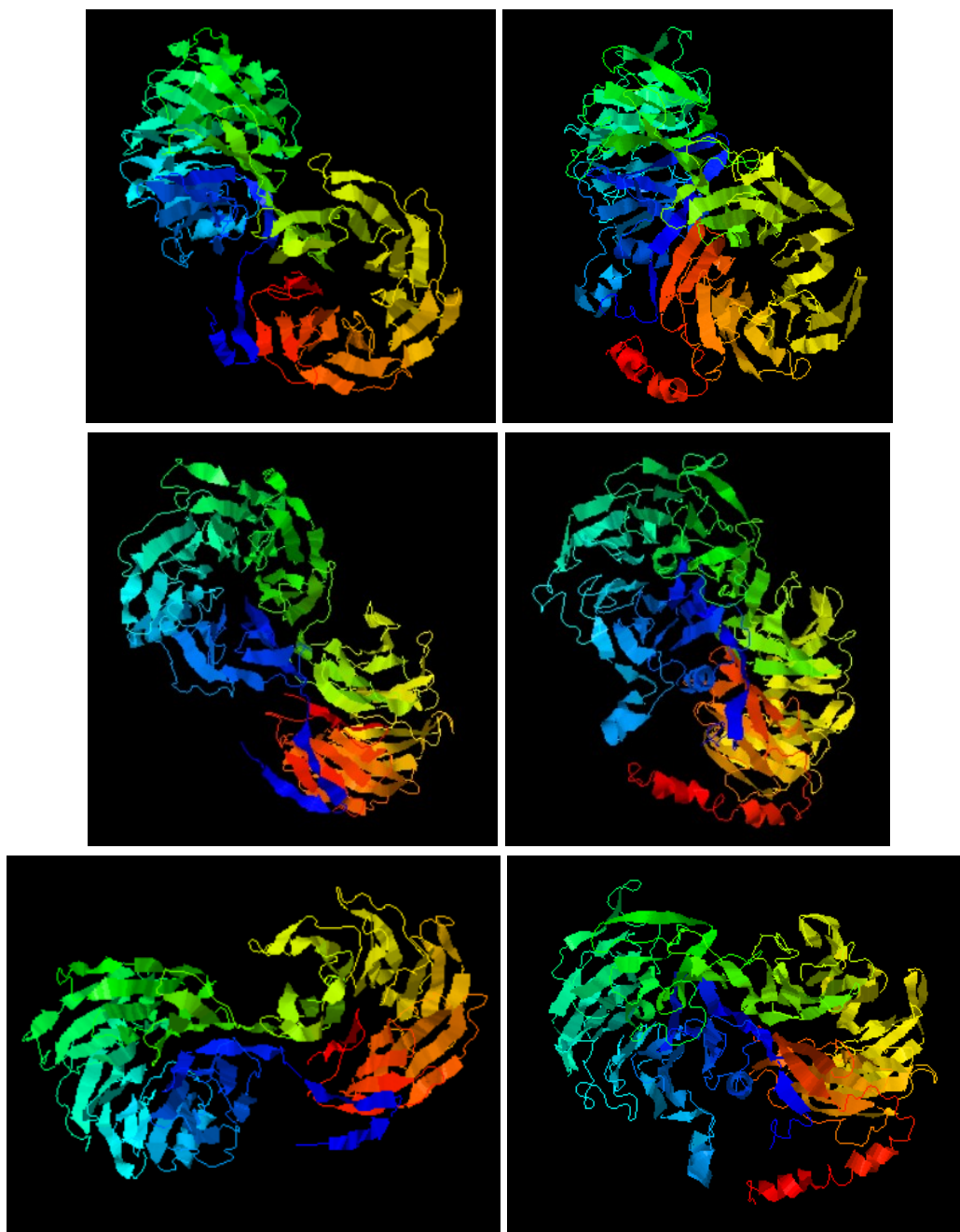
Pro porovnání 3D struktury proteinu DIC6939 se známými axonemálními a cytoplasmatickými dyneiny byl využit program I-TASSER (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang and Zhang, 2015). Program navrhne model na základě sekvenční podobnosti proteinu s proteinem známé struktury, přičemž není zohledňována funkce či další vlastnosti. V případě proteinu DIC6939 byl programem vybrán protein neznámé funkce ze sinice *Noctos punctiforme*, v Protein Data Bank nesoucí označení 2YMU. Z navržených modelů byl vybrán model s nejvyšším C-skóre, což je hodnota vyjadřující podobnost sekvence zkoumaného proteinu se sekvencí templátového proteinu (2YMU). Standardní hodnota C-skóre se nachází v rozmezí -5 a 2. Čím vyšší je skóre, tím vyšší je pravděpodobnost, že daný model odpovídá skutečnosti. V případě DIC6939 bylo C-skóre -1,02. Pro vizuální srovnání 3D struktury byl vybrán potenciální homologní protein - lidský axonemální střední řetězec dyneinu (NP_036276) a lidský cytosolický střední řetězec dyneinu (NP_004402).

Srovnání navržených modelů proteinů DIC6939 a lidského středního řetězce (IC) axonemálního dyneinu je zobrazeno na obrázku 17. Na snímcích jsou proteiny vizualizovány z různých úhlů. Dvě velké domény tvoří takzvané vrtulové struktury (z anglického výrazu beta-propeller fold), které typicky zaujímá WD40 doména. Beta-vrtule lze najít ve velké řadě proteinů různých funkcí (Smith et al., 1999). Ve středních řetězcích dyneinu obvykle tvoří C-konec proteinu, který slouží k vazbě na těžké řetězce. Ze srovnání je patrné, že navržená konformace proteinů je velmi podobná.

Na obrázku 16 je pro srovnání zobrazena 3D struktura lidského cytoplasmatického středního řetězce dyneinu. I zde je zřetelně vidět vrtulová struktura, sloužící k vazbě na těžký řetězec. Na rozdíl od axonemálních dyneinů je zde však pouze jedna. Rozdíly mezi cytoplasmatickým a axonemálními dyneiny lze pozorovat i ve zbývající části struktury odpovídající N-konci proteinu.

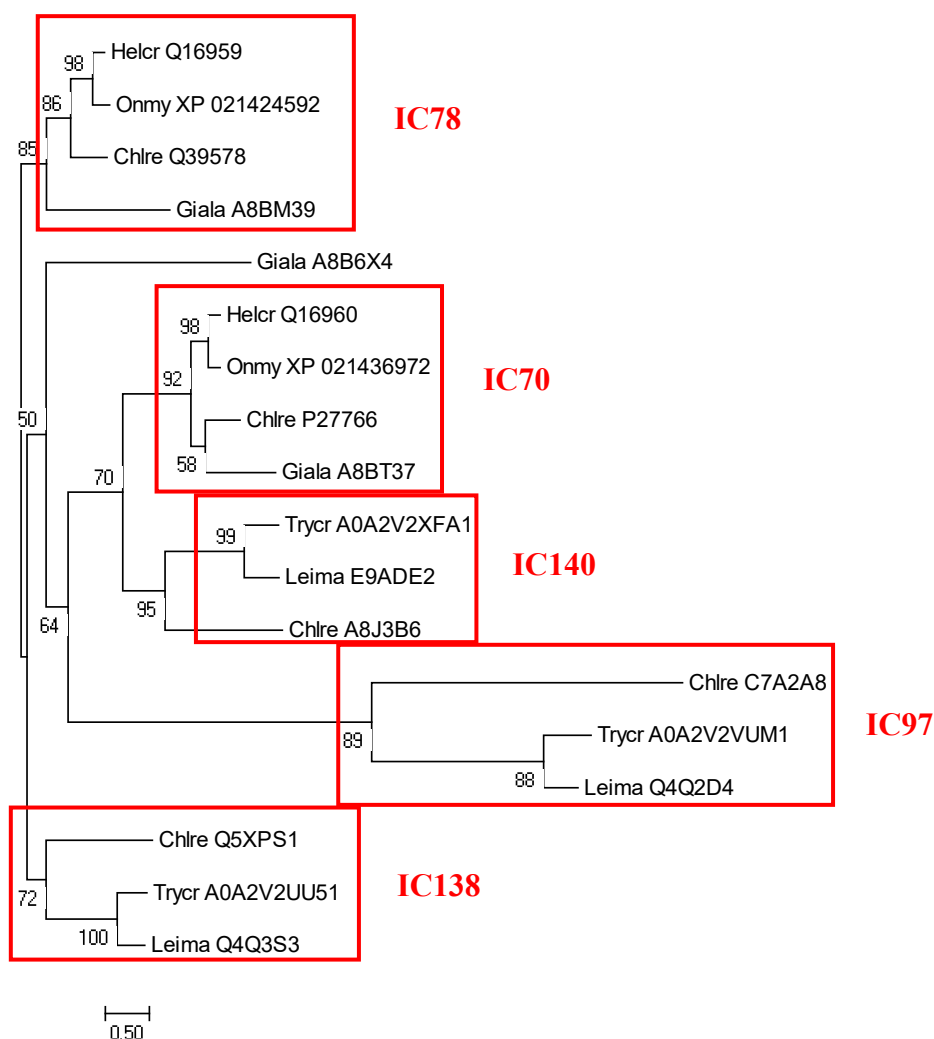


Obrázek 16: 3D model lidského středního řetězce cytosolického dyneinu (NP_004402). Model byl predikován pomocí programu I-TASSER. C-skóre modelu je -1,15, nejvyšší z navržených modelů. Na snímku je možné pozorovat vrtulovou strukturu nacházející se typicky na C-konci proteinu a sloužící k vazbě na těžké řetězce dyneinů.



Obrázek 17: Srovnání 3D modelu proteinu *G. intestinalis* DIC6939 (vlevo) a lidského středního řetězce axonemálního dyneinu 1 (NP_036276; vpravo). Modely byly predikovány programem I-TASSER. Model DIC6939 má hodnotu C-skóre -1,02 a model lidského IC1 -1,43. U obou jde o nejvyšší hodnotu z navržených modelů. Na obrázcích jsou proteiny zobrazeny ze tří různých úhlů. Na horních snímcích (první a druhá řada) lze vidět takzvané vrtulové struktury, do nichž se standardně uspořádává WD40 doména. Na spodních snímcích (třetí řada) je vidět, že dvě beta-vrtule jsou propojeny můstkem. Z obrázků je patrné, že v případně správnosti predikce modelu by proteiny zaujímaly velmi podobnou konformaci.

V kapitole 2.2 je vysvětleno rozdělení axonemálních dyneinů na dyneiny vnitřního a vnějšího raménka. Studie ukázaly, že jednotlivé střední řetězce axonemálních dyneinů různých organismů tvoří homologní skupiny a jsou evolučně konzervované (Ogawa et al., 1995). Proteiny spadající do konkrétní skupiny od různých organismů jsou si tedy podobnější, než sekvence středních řetězců dyneinu v rámci jednoho organismu. Pro zařazení proteinů *G. intestinalis* do skupin axonemálních dyneinů byla provedena další fylogenetická analýza (obrázek 18) zahrnující mimo jiné experimentálně ověřené střední řetězce dyneinu organismů *Chlamydomonas reinhardtii*, *Oncorhynchus mykiss* a *Heliocidaris crassispina*, u nichž je známý vztah ke konkrétním skupinám axonemálních dyneinů. Parametry této fylogenetické analýzy byly shodné s předchozí (obrázek 15).



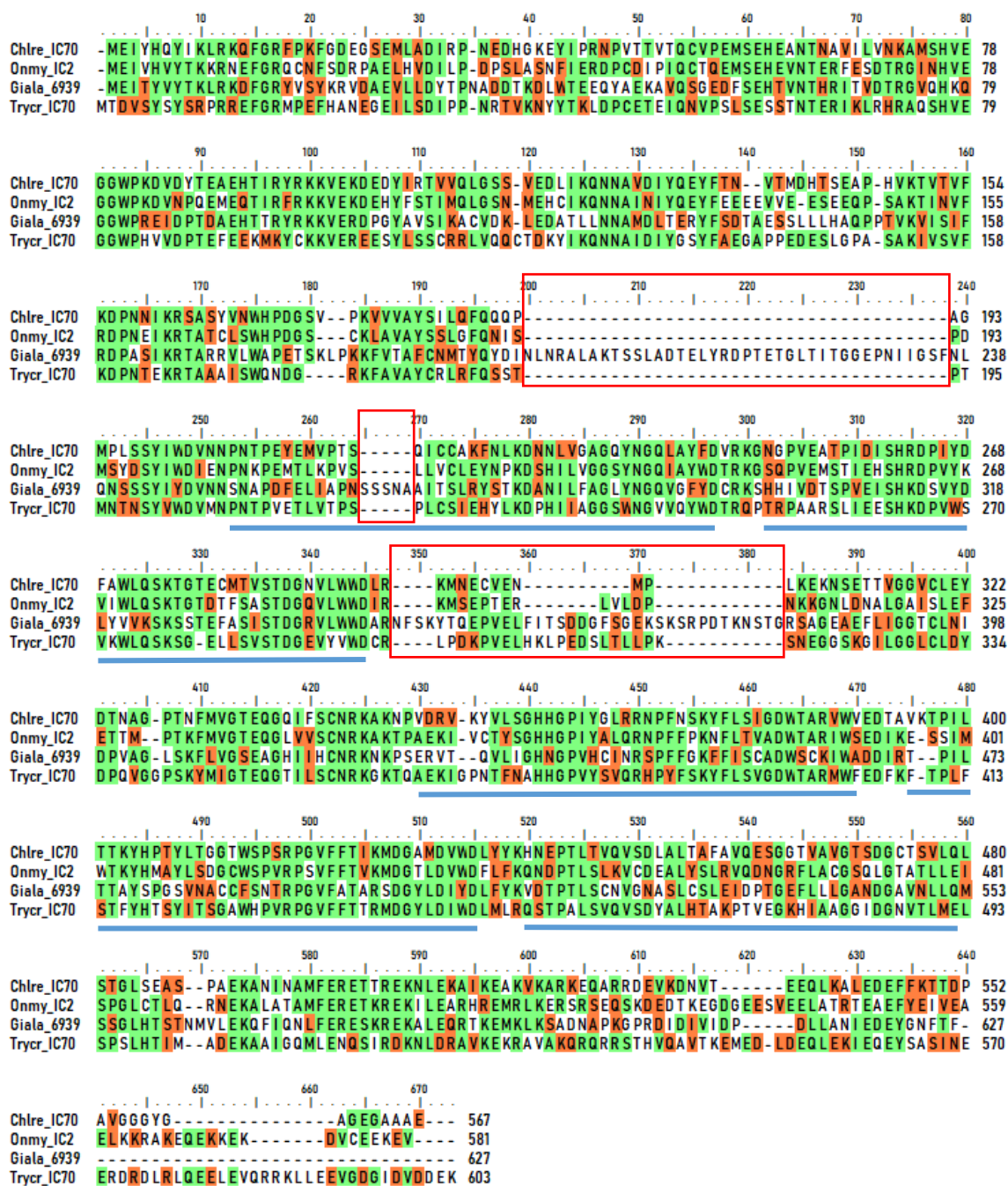
Obrázek 18: Fylogenetická analýza metodou „maximum likelihood“ zařazující střední řetězce dyneinu *G. intestinalis* do kontextu homologních skupin axonemálních dyneinů. Jednotlivé skupiny homologních proteinů (červené rámečky) byly identifikovány dle dobře prostudovaných středních řetězců dyneinu organismu *Chlamydomonas reinhardtii*. Dle výzkumů prováděných na *Ch. reinhardtii* patří IC70 a IC78 mezi dyneiny vnějšího raménka a IC97, IC138 a IC140 mezi dyneiny vnitřního raménka. Dva z dyneinů *G. intestinalis* spadaly do skupin dyneinů vnějších ramének IC70 (DIC6939; Giala A8BT37) a IC78 (GI50803_33218; A8BM39). Třetí protein GI50803_10254 (A8B6X4) se fylogeneticky neblížil žádné ze skupin. Chlre, *Chlamydomonas reinhardtii*; Giala, *G. intestinalis*; Helcr, *Heliocidaris crassispina*; Leima, *Leishmania major*; Onmy, *Oncorhynchus mykiss*, Trycr, *Trypanosoma cruzi*.

Druhá fylogenetická analýza (obrázek 18) ukázala, že dva z predikovaných středních řetězců dyneinu *G. intestinalis* jsou evolučně blízké proteinům, patřícím mezi dyneiny vnějšího raménka axonemálního dyneinu – IC70 (DIC6939) a IC78 (GI50803_33218). Zbývající dynein GI50803_10254 nevykazoval podobnost s žádnou z definovaných skupin, prozatím tedy není možné ho zařadit mezi dyneiny vnějšího/vnitřního raménka.

Posledním krokem charakterizace proteinu DIC6939 *in silico* byl alignment jeho sekvence s proteiny patřícími do skupiny dyneinů IC70. Do alignmentu byly zařazeny experimentálně ověřené střední řetězce dyneinů od organismů *Chlamydomonas reinhardtii* a *Oncorhynchus mykiss* a predikovaný IC70 organismu *Trypanosoma cruzi*. Alignment byl vytvořen programem ClustalW v softwaru MEGA 7.0.

Z alignmentu (obrázek 19) je patrná velká sekvenční podobnost vybraných proteinů. Zelená barva značí identické aminokyseliny, oranžová podobné. Práh pro zvýraznění je 50 % zbytků. V alignmentu byly zvýrazněny úseky insercí specifických pro giardiový protein DIC6939 (červený rámeček).

Pro střední řetězec dyneinu jsou typické WD40 domény, obsahující různý počet WD40 repetit. Pro identifikaci těchto repetit byl použit program InterPro (Mitchell et al., 2019). Software odhalil ve studovaném proteinu přítomnost pěti WD40 repetit, a to v pozicích aminokyselin 255 - 295, 303 - 343, 426 - 465, 470 - 508 a 513 - 552. Oblasti WD repetit byly v alignmentu vyznačeny modrou čarou pod sekvencí (obrázek 19). Kvůli insercím v genu DIC6939 byly vyznačeny WD domény predikované pro IC70 *Ch. reinhardtii* (206 – 245, 250 – 293, 351 – 390, 395 – 435 a 440 – 479).

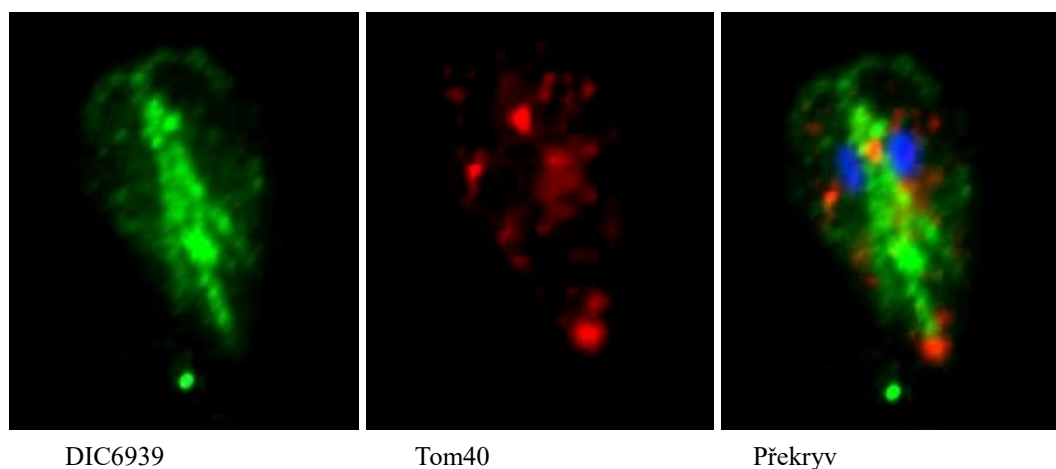


Obrázek 19: Alignment proteinů patřících mezi střední řetězce dyneinů IC70. Chltre, *Chlamydomonas reinhardtii*; Onmy, *Oncorhynchus mykiss*; Giala, *Giardia intestinalis*; Trycr, *Trypanosoma cruzi*. Identické aminokyseliny jsou označeny zeleně, podobné oranžově (s prahem zvýraznění 50 % zbytků v dané pozici). Červené rámečky označují prominentní insertce v genu *G. intestinalis*. Modré čáry pod sekvencí značí oblasti WD repetice.

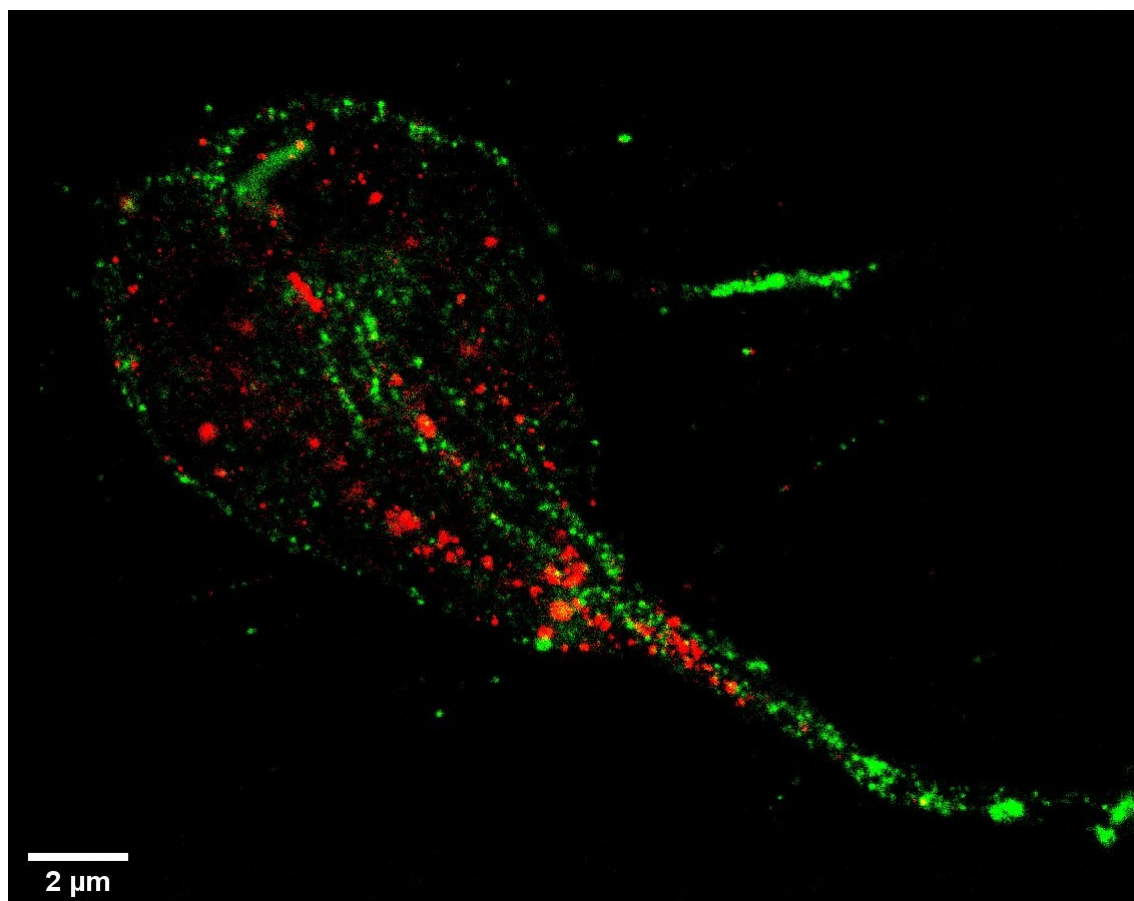
5.5 Mikroskopická analýza buněčné lokalizace

Možná kolokalizace proteinu DIC6939 s mitosomy byla detekována pomocí fluorescenční mikroskopie, nejprve „widefield“ mikroskopem Nikon Eclipse Ti-S a poté superrezolučním STED mikroskopem. Jako marker mitosomů byl zvolen protein vnější mitosomální membrány Tom40, neboť je proteinem s nímž byl izolován DIC6939 a zároveň k němu v naší laboratoři byla dostupná králičí protilátka. Druhou použitou byla primární myší α -BAP protilátka. Pro Nikon Eclipse byly použity sekundární protilátky s navázanou Alexa Fluor 488 a 594. Pro superrezoluční mikroskopii byly použity protilátky Abberior STAR 635P a 580 (viz kapitola 4.11.5).

Na preparátech se pomocí protilátek podařilo úspěšně vizualizovat oba proteiny. „Widefield“ fluorescenční mikroskopie se kvůli nízkému rozlišení ukázala jako nedostačující (obrázek 20), bylo proto přistoupeno k použití STED mikroskopu. Na první pohled nelze ani při velkém rozlišení usuzovat, že proteiny kolokalizují (obrázek 21). Kvůli široké distribuci proteinu DIC6939 v buňce nelze s jistotou říct, zda je pozorovaná blízkost proteinů náznak možné interakce či pouze artefakt. Lepší vizualizaci by bez pochyby umožnila specifická protilátka proti endogennímu DIC6939.



Obrázek 20: Detekce kolokalizace DIC6939 a Tom40 pomocí widefield fluorescenční mikroskopie. Protein DIC6939 (zeleně) byl vizualizován pomocí primární myší α -BAP protilátky a sekundární protilátky fúzované s Alexa 488. Protein Tom40 (červeně) byl vizualizován primární králičí α -Tom40 protilátkou a sekundární protilátkou fúzovanou s Alexa 594. Jádra (modře) byla značena pomocí DAPI. Je patrné, že z překryvné fotografie nelze usuzovat možnou kolokalizaci proteinů DIC6939 a Tom40. Zvětšeno 1000x.



DIC6939 Tom40

Obrázek 21: Detekce kolokalizace DIC6939 a Tom40 vizualizovaná pomocí superrezoluční mikroskopie. DIC6939 (zeleně) byl detekován primární myší α -BAP protilátkou a sekundární Abberior STAR 580 protilátkou. Tom40 (červeně) byl vizualizován primární králičí α -Tom40 protilátkou a sekundární Abberior STAR 635P. Velké rozlišení snímku pořízeného superrezolučním mikroskopem umožnilo lepší vizualizaci potenciální kolokalizace studovaného proteinu a proteinu Tom40. Na snímku není patrný překryv signálů těchto proteinů, ale na mnoha místech, především v prostoru centrálních mitosomů a posteriorní části buňky je patrná jejich fyzická blízkost. Hojně rozšíření signálu proteinu DIC6939 znemožňuje s jistotou říct, zda jsou to místa možného kontaktu, nebo pouze artefakt.

5.6 Determinace topologie proteinu DIC6939

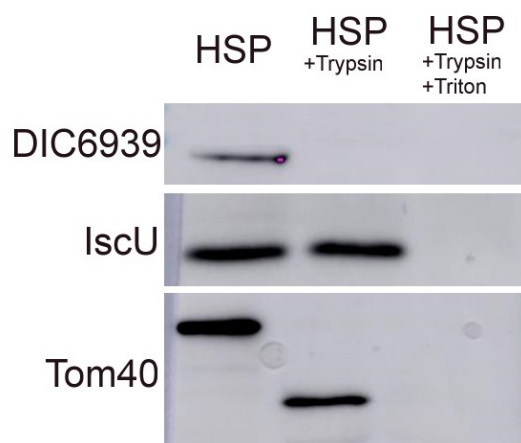
K determinaci topologie proteinu byly použity dvě metody. Analýza pomocí proteázy trypsinu sloužila k popsání extraorganelárního či intraorganelárního umístění proteinu, neboť trypsin má přístup pouze k proteinům nacházejícím se nebo vyčnívajícím do cytosolu. Extrakce uhličitánem sodným determinovala zda je protein ukotven v membráně nebo jestli je solubilní či pouze s membránou asociovaný.

Zkoumaný protein dle bioinformatické analýzy nemá žádné transmembránové domény. Přesto byl po frakcionaci buněk detekován jak v cytosolické, tak v membránové frakci. Další práce měla proto objasnit, zda se protein detekovaný v membránové frakci nachází extraorganelárně či intraorganelárně.

5.6.1 Analýza odolnosti vůči trypsinu

Proteáza trypsin degraduje proteiny nacházející se v cytosolu či ležící na vnější straně organely. Proteiny odolné vůči trypsinu jsou tedy buď ukryté přímo v membráně, nebo uvnitř organely. Při této analýze byly jako kontrola použity dva proteiny – *GiIscU* a *GiTom40*. *GiIscU* je protein nacházející se v mitosomální matrix, je tedy před působením exogenně přidaného trypsinu chráněn. *GiTom40* je částí ukotven v membráně a částečně vyčnívá do cytosolu, tato cytosolická část je tedy trypsinem degradována. Další kontrolou správného provedení je přidání Tritonu X-100, detergentu solubilizujícího membrány. Ve vzorku obsahujícím Triton by proto mělo dojít k degradaci všech tří detekovaných proteinů.

Výsledek testu odolnosti proteinu DIC6939 proti trypsinu byl analyzován metodou western blot (obrázek 22). Analýza ukázala, že je protein po přidání trypsinu k HSP degradován, nachází se tedy na vnější straně organely, resp. mikrotubulů, což indikuje, že je protein přístupný pro proteázu. IscU zůstalo chráněno, zatímco Tom40 byl částečně degradován. Po přidání Tritonu došlo k úplné degradaci obou kontrolních proteinů. Kontroly naznačují, že pokus byl proveden správně. Degradace DIC6939 trypsinem by mohla být dalším indikátorem, že je tento protein součástí vnějšího raménka axonemálního dyneinu. Pro ověření této informace by ovšem bylo vhodné použít specifické kontroly pro určení topologie v rámci axonemy a ověřit, zda dochází k degradaci vnitřního raménka.



Obrázek 22: Analýza odolnosti proteinu DIC6939 vůči proteáze trypsinu. Western blot byl značen protilátkami α -BAP v případě DIC6939, α -IscU a α -Tom40. DIC6939 je po přidání trypsinu degradován, IscU zůstává nedotčen a u proteinu Tom40 dochází k degradaci části vyčnívající do cytosolu. Po přidání tritonu dochází k degradaci všech detekovaných proteinů, což značí správné provedení pokusu.

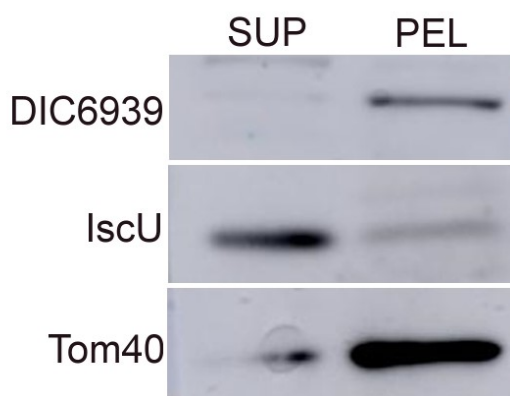
5.6.2 Extrakce uhličitanem sodným

Extrakce uhličitanem sodným pomáhá determinovat, zda je protein nacházející se v sedimentující frakci transmembránový, nebo pouze s membránou asociovaný. Výsledkem analýzy jsou dvě frakce – supernatant a pelet. V supernatantu lze nalézt proteiny s membránou asociované, ovšem nikoliv transmembránové. V peletu se nachází proteiny vázané na membránu prostřednictvím transmembránové domény.

U proteinu DIC6939 nebyl predikován žádný transmembránový helix, což koresponduje s topologií středního řetězce dyneinu. Zároveň nebyla v souladu s charakterem tohoto proteinu

předpokládána asociace s membránami. Tato analýza proto posloužila jako indikace toho, zda při extrakci uhličitanem sodným dojde k uvolnění dyneinových molekulárních motorů z mikrotubulů. Jako kontroly byly opět použity proteiny IscU a Tom40. IscU zastupovalo proteiny solubilní, nalézané v supernatantu, zatímco Tom40 proteiny s transmembránovou doménou spadající do peletové frakce.

Výsledek extrakce byl opět analyzován pomocí metody western blot. Protein IscU se nacházel v supernatantu a Tom40 v peletu, což potvrdilo správné provedení pokusu. Zkoumaný protein DIC6939 byl nalezen v peletu, což znamená, že je resistantní k extrakci uhličitanem sodným (obrázek 23). V kontextu dyneinu lze konstatovat, že pravděpodobně nedochází k jeho uvolnění z mikrotubulárních struktur.



Obrázek 23: Extrakce proteinu DIC6939 uhličitanem sodným. Western blot byl značen pomocí primárních α -BAP, α -IscU a α -Tom40 protilátek. Protein Tom40 je ukotven v membráně transmembránovými doménami, proto se nachází v peletu. IscU je protein solubilní, je tedy značen v supernatantu. Studovaný protein DIC6939 se nachází v peletové frakci, což pravděpodobně znamená, že při extrakci uhličitanem sodným nedochází k jeho uvolnění z mikrotubulů.

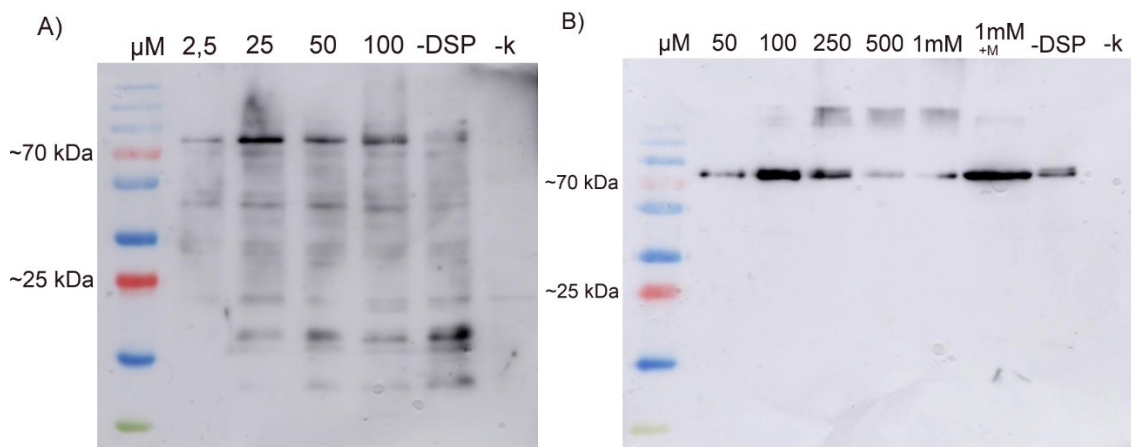
5.7 Analýza interagujících proteinů

Součástí mé práce byla snaha identifikovat potenciální interakční partnery proteinu DIC6939 pomocí chemického crosslinku a následné izolace vzniklých komplexů. Pro funkčnost pokusu bylo třeba použít dvojité transfekované buňky episomálně exprimující plasmidy pTG s proteinem DIC6939 a pUC57-mini s cytosolickou BirA. BAP tag připojený k proteinu DIC6939 byl biotinylován episomálně exprimovanou biotin ligázou. Vazba biotinu na BAP tag se využívá pro izolaci proteinů prostřednictvím jeho silné afinity ke streptavidinu. V mé práci byly k tomuto účelu použity magnetické kuličky Dynabeads s navázaným streptavidinem.

5.7.1 Testování optimální koncentrace crosslinkeru

Před samotným provedením izolace bylo třeba otestovat, jaká je optimální koncentrace crosslinkeru v kombinaci s proteinem DIC6939. Crosslinker DSP byl použit pro crosslinkování proteinů v živých trofozoitech *G. intestinalis*. Byly testovány koncentrace 2,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M a 1mM. Kvůli existenci disulfidického můstku uvnitř DSP musel pokus probíhat za neredukujících podmínek. Součástí pokusu byly také negativní kontroly, ověřující zda ke vzniku komplexů nedochází také v nepřítomnosti DSP a zda dochází za redukcí k jejich rozpadu. Výsledky byly detekovány pomocí metody western blot.

Přibližně od 100 μM koncentrace DSP bylo možné pozorovat tvorbu komplexů. Jako optimální se jevila koncentrace 250 μM , kde byl patrný úbytek proteinu DIC6939 oproti koncentraci 100 μM (obrázek 24). Po přidání merkaptetanolu ke kontrole s 1mM DSP došlo ke zpětnému rozpadu komplexu. Ve vzorcích, kde bylo DSP nahrazeno DMSO (-DSP) se komplexy netvořily.



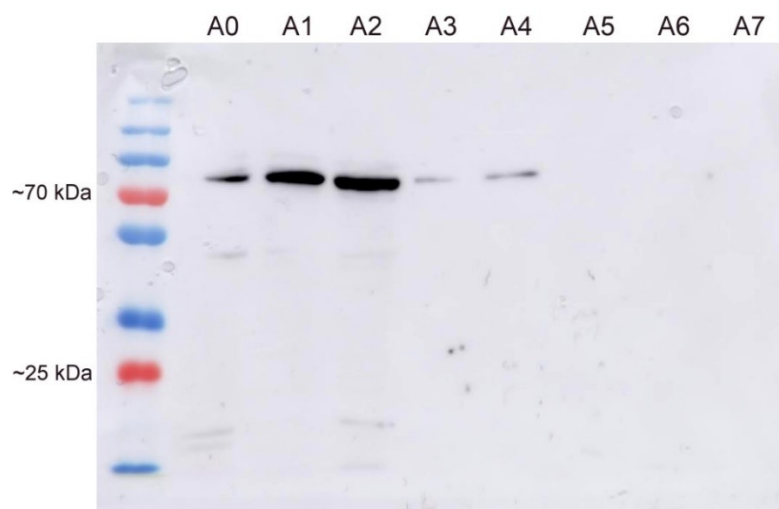
Obrázek 24: Testování optimální koncentrace crosslinkeru DSP pro použití s proteinem DIC6939. Obě membrány byly značeny primární králičí α -BAP protilátkou a sekundární α -králičí protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou. Čísla v horní řadě uvádí použitou koncentraci DSP (μM pokud není uvedeno jinak) v daném vzorku. Na snímku A) lze pozorovat tvorbu komplexu ve vzorku se 100 μM DSP. Protože nebyl pozorován úbytek proteinu DIC6939, bylo třeba otestovat vyšší koncentrace DSP. Na snímku B) je od 100 μM koncentrace možné sledovat úbytek proteinu DIC6939. Zároveň při 250 μM koncentraci DSP zřetelně vidíme vzniklý komplex. Tato koncentrace byla proto vybrána jako optimální. Negativní kontrola (-k) pro protilátku α -BAP ukázala specifitu pozorovaných bandů. Ve vzorcích bez DSP (-DSP) nedocházelo ke vzniku komplexů. Po přidání merkaptetanolu ke vzorku s 1mM DSP došlo k opětovnému rozpadu komplexu.

5.7.2 Chemický crosslink a pulldown pomocí Dynabeads

Po determinaci vhodné koncentrace crosslinkeru bylo možné provést samotnou izolaci. Po namnožení buněk ve velkém objemu média byly buňky stáčeny a resuspendovány v PBS s inhibitory proteáz. Z této suspenze byl odebrán kontrolní vzorek A0. Suspenze byla poté naředěna na výslednou koncentraci proteinu 1 mg/ml. Vzorek byl inkubován s DSP v koncentraci 250 μM . Reakce byla zastavena přidáním 50mM Tris. Po centrifugaci při 30 000 x g byl vzniklý pelet uchován jako kontrola A1 a malá část supernatantu jako alikvót A2. Vzorek byl následně ředěn 10x v inkubačním pufru, načež byla odebrán alikvót A3.

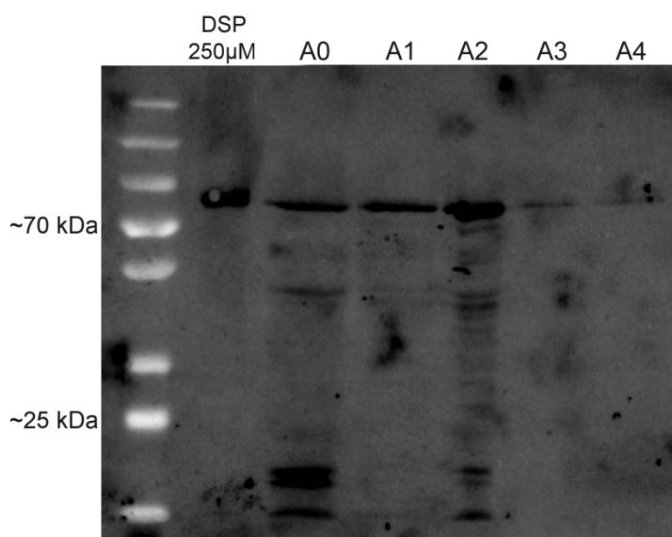
Kuličky Dynabeads s navázaným streptavidinem byly po promytí smíchány s celým objemem vzorku a inkubovány hodinu při pokojové teplotě a přes noc na rotátoru ve 4 °C. Pro oddělení kuliček od supernatantu byl používán magnetický stojánek. Alikvót A4 byl odebrán po noční inkubaci ze vzorku, od něž byly odděleny kuličky. Při správném průběhu pokusu by se v této kontrole již neměl nacházet biotinylovaný protein, případně pouze jeho minimum. Kuličky s navázaným proteinem byly poté promývány (viz 4.14.3) a v průběhu promývání byly odebrány alikvóty A5 a A6, oba bez kuliček. Vzorek A7 pak obsahoval materiál uvolněný z kuliček po jejich inkubaci při 95 °C a přidání volného biotinu. V tomto vzorku by se proto měl objevit studovaný protein. Výsledek pokusu byl detekován pomocí metody western blot (obrázek 25).

Při vyhodnocení výsledků byl pozorován protein DIC6939 v alikvótu A4 a naopak nebyl pozorován v alikvótu A7. Tento výsledek indikuje, že nedošlo k navázání proteinu na Dynabeads.



Obrázek 25: Kontroly A0-A7 izolace proteinu DIC6939 a jeho interakčních partnerů za použití DSP. Membrána byla značena primární králičí α -BAP protilátkou. V A0 vidíme protein po resuspendování kultury v PBS s inhibitory proteáz. A1 a A2 ukazují pelet a supernatant získaný centrifugací z buněk inkubovaných s DSP. V alikvótu A3 došlo k naředění alikvótu A2 10x. Alikvót A4 byl odebrán po inkubaci s Dynabeads s navázaným streptavidinem. V tomto vzorku nejsou přítomny kuličky, neměl by zde tedy již být pozorován studovaný protein. A5 a A6 byly odebrány při promývání. V těchto kontrolách není při správném provedení procedury očekáván studovaný protein. Naopak přítomnost proteinu v alikvótu A7 by naznačovala úspěšné navázání studovaného proteinu na Dynabeads se streptavidinem. Z membrány je tedy zřetelné, že protein se na kuličky nenavázal.

Dalším krokem práce byla snaha odhalit důvod nenavázání proteinu na kuličky. Použitím konjugátu streptavidinu a Alexa Fluor 488 při značení membrány western blotu bylo ověřeno, zda je protein v průběhu pokusu biotinylován. Na obrázku 26 je patrná biotinylace proteinu ve všech vzorcích.



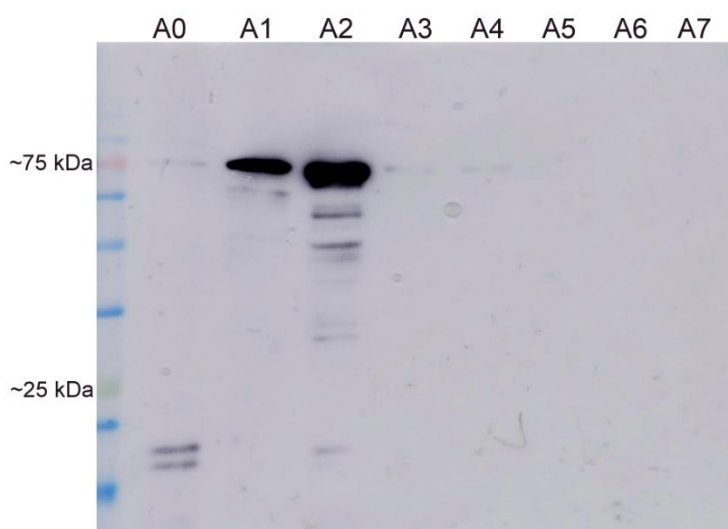
Obrázek 26: Ověření biotinylace v průběhu izolace. Membrána byla značena konjugátem streptavidinu s Alexa Fluor 488. DSP 250 μ M je vzorek shodný se vzorkem použitým při testování optimální koncentrace crosslinkeru. Vzorky A0 až A4 jsou identické se vzorky pozorovanými na obrázku 25. U všech vzorků je možné zřetelně pozorovat biotinylovaný DIC6939.

Ověření pomocí streptavidinu prokázalo, že problém pokusu nepramení z absence biotinylace. Bylo proto třeba zjistit, proč se protein během pokusu neváže na magnetické kuličky se streptavidinem. Zvažovány byly dva potenciální problémy. Prvním bylo optimální složení roztoků pro správný průběh reakce a zároveň funkčnost kuliček. Druhým byla tvorba komplexů v rámci crosslinku, které zabrání kontaktu biotinu a streptavidinu. Vzorky na obrázku 26 totiž nekorespondují se stavem při izolaci, neboť vyjma vzorku DSP 250 μ M byly vzorky redukovány pomocí merkaptoetanolu a všechny denaturovány vysokou teplotou, což mohlo vést ke zpřístupnění biotinu. Problém s optimálním složením roztoků či nefunkčnost kuliček byly empiricky vyloučeny izolací odlišného proteinu.

5.7.3 Izolace DIC6939 bez chemického crosslinkeru

K ověření zda je důvodem absence vazby biotinu na streptavidin tvorba komplexů zamezujících jejich kontaktu byla izolace provedena bez chemického crosslinkeru. Vzorky byly připravovány jako při standardní izolaci s vynecháním kroku inkubace s crosslinkerem a následného zastavení reakce pomocí Tris.

Ani při pokusu o izolaci proteinu DIC6939 bez DSP se nepodařilo protein navázat na kuličky se streptavidinem, jak je zřetelné z obrázku 27, vzorku A7. To indikuje, že nedochází k vazbě biotinylovaného DIC6939 v nativním stavu na streptavidin. Důvodem může být sbalení monomerního proteinu do konformace znemožňující přístup streptavidinu k biotinu.



Obrázek 27: Izolace DIC6939 bez přidaného crosslinkeru. Alikvóty A0 – A7 odpovídají standardním kontrolám (obrázek 25). Membrána byla značena primární králičí α -BAP protilátkou. Stejně jako v kapitole 5.5.2, i zde vidíme, ač velmi slabě, protein v kontrolním alikvótu A4. Studovaný protein opět nebyl pozorován ve vzorku A7, nedošlo tedy k jeho navázání na streptavidinem pokryté kuličky.

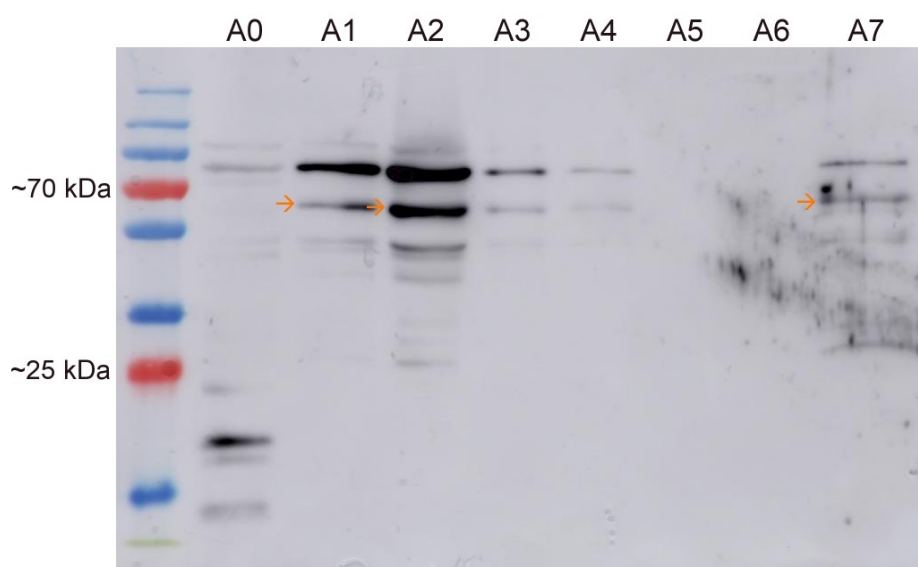
5.7.4 Izolace DIC6939 s redukčním činidlem

Po pokusu dokazujícím že za nativních podmínek nedochází k vazbě DIC6939 na Dynabeads se streptavidinem byla otestována vazba biotinu na streptavidin za redukujících podmínek. K tomuto účelu byl využit 100mM dithiotreitol (DTT). Ze standardního protokolu byl vynechán

krok zahrnující inkubaci s crosslinkerem a následné zastavení reakce pomocí Tris. Zároveň byla provedena postupná denaturace (viz kapitola 4.14.5), nejprve bez SDS, následně s 1% SDS. DTT bylo přidáváno od první centrifugace při 30 000 x g po celý zbytek pokusu. Výsledek byl ověřen pomocí metody western blot.

Výsledek ukázal, že při použití tohoto protokolu dochází k navázání proteinu na Dynabeads se streptavidinem (obrázek 28). Bandy byly vizualizovány až při použití silného substrátu, což značí, že se podařilo navázat poměrně malé množství proteinu. Zbývající vzorek A7 bez Dynabeads byl separován pomocí SDS-PAGE a odeslán na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Ta měla ověřit, zda se na Dynabeads skutečně váže studovaný protein.

Další zajímavou skutečností vyplývající z výsledku této izolace je poměrně výrazný band o velikosti necelých 70 kDa, který se objevuje pouze při použití tohoto protokolu (obrázek 28, oranžové šipky).



Obrázek 28: Izolace DIC6939 za redukováných podmínek. Membrána byla značena primární králičí α -BAP protilátkou. Alikvóty A0 – A7 byly odebrány dle protokolu v kapitole 4.14.5. Ke vzorkům odpovídajícím alikvótům A1 až A7 byl vždy přidáván 100mM DTT. Z alikvótu A7 je zřetelné, že došlo k navázání proteinu DIC6939 na Dynabeads. Oranžové šipky značí band vznikající pouze při izolaci s DTT a postupné denaturaci.

Zbýlý vzorek byl rozdělen pomocí SDS-PAGE a gel byl po obarvení rozdělen na dvě poloviny (horní a dolní, hranice cca 50 kDa) pro analýzu hmotnostní spektrometrií. Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrií jsou uvedeny v tabulce 10. V obou částech gelu byl nalezen studovaný protein DIC6939, v horní části byl nejčastěji nalézáným proteinem. Jednotlivé identifikované peptidy proteinu DIC6939 jsou zobrazeny na obrázku 29. Protože nebyl použit crosslinker, nelze ostatní nalezené proteiny považovat za potenciální interakční partnery. Tyto kontaminující proteiny se z velké části řadí mezi ribozomální proteiny, tubuliny a enzymy ornitinového cyklu a lze konstatovat, že jde o proteiny hojně se vyskytující v eukaryotických buňkách.

Přestože hmotnostní spektrometrie prokázala úspěšné navázání studovaného proteinu na Dynabeads, použití DTT v tomto pokusu znemožnilo využít tento protokol pro izolaci DIC6939 s jeho potenciálními interakčními partnery provázanými pomocí crosslinkeru DSP.

Samotný DSP se totiž kvůli přítomnému disulfidickému můstku rozkládá na dvě poloviny a došlo by proto k rozvolnění vazby mezi studovaným proteinem a jeho partnery.

Tabulka 10: Proteiny identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie. V horní části gelu byl nejvícekrát nalezen právě studovaný protein DIC6939 (tučně). V dolní části gelu byl tento protein nacházen také.

HORNÍ ČÁST GELU		DOLNÍ ČÁST GELU	
ID proteinu	Anotace	ID proteinu	Anotace
GL50803_6939	Střední řetězec dyneinu	GL50803_14620	Ribozomální protein S6
GL50803_112079	Alfa-tubulin	GL50803_14699	Ribozomální protein S23
GL50803_11231	Protein neznámé funkce	GL50803_19003	Ribozomální protein L24A
GL50803_9861	Protein neznámé funkce	GL50803_11950	Ribozomální protein L18
GL50803_136021	Beta-tubulin	GL50803_16431	Ribozomální protein L19
GL50803_11950	Ribozomální protein L18	GL50803_5845	Ribozomální protein S8
GL50803_5359	Nukleolární protein NOP5	GL50803_10428	Ribozomální protein L10
GL50803_10311	Ornitin karbamoyltransferáza	GL50803_4652	Ribozomální protein S16
GL50803_112103	Arginin deimináza	GL50803_14622	Ribozomální protein L13
GL50803_16431	Ribozomální protein L19	GL50803_16265	Ribozomální protein S3a
GL50803_16525	Ribozomální protein L3	GL50803_6939	Střední řetězec dyneinu

```

MEITYVYTKLRKDFGRVVSYKRVD AEVLLDYPNADDTKDLWTEEQYAEKAVQSGEDFSEHTVNTHRITVDTRGVQHKQGGWP 83
MEITYVYTK          RVDAEVLLDYPNADDTK          AVQSGEDFSEHTVNTHR
MEITYVYTK          VDAEVLLDYPNADDTK          AVQSGEDFSEHTVNTHR
          RVDAEVLLDYPNADDTKDLWTEEQYAEK
          RVDAEVLLDYPNADDTK
          DLWTEEQYAEK
REIDPTDAEHTTRYRKKVERDPGYAVSIKACVDKLEDATLLNNAMD LTERYFSDTAESSLLHAQPPTVKVISIFRDPASIKRTARRV 171
          DPGYAVSIK          YFSDTAESSLLHAQPPTVK
          YFSDTAESSLLHAQPPTVK
          VISIFRDPASIKR
LWAPETSKLPKKFVTAFCNMTYQYDINLNRALAKTSSLADTELYRDP TETGLTITGGEPNIIGSFNLQNSSYIYDVNNSNAPDFELI 259
          TSSLADTELYR
          TSSLADTELYR
APNSSSNAITSLRYSTKDANILFAGLYNGQVGFYDCRKSHHIVDTSPVEISHKDSVYDLYVVKSSSTEFASISTDGRVLWWDARN 346
          SHHIVDTSPVEISHKDSVYDLYVVK  SSTEFASISTDGR
          SHHIVDTSPVEISHK  SSTEFASISTDGR
          DSVYDLYVVK
          DSVYDLYVVK
FSKYTQEPVELFITSDDGFSGEKSKSRPDTKNSTGRSAGEAEFLIGGTCLNIDPVAGLSKFLVGSEAGHIIHCNRKNKPSERV TQVLIG 435
YTQEPVELFITSDDGFSGEK          SAGEAEFLIGGTCLNIDPVAGLSK
YTQEPVELFITSDDGFSGEK
HNGPVHGINRSPFFGKFISCADWCKIWADDIRTPILTAYSPGSVNACCFSNTRPGVFATARSDGYLDIYDLFYKVDTPTLSCNV 522
          SDGYLDIYDLFYK
          SDGYLDIYDLFYK
GNASLCSLEIDPTGEFLLGANDGAVNLLQMSSGLHTSTNMVLEKQFIQNLFERESKREKALEQRTKEMKLSADNAPKGPRDID 607
IVIDPDLLANIEDEYGNFTF 627/

```

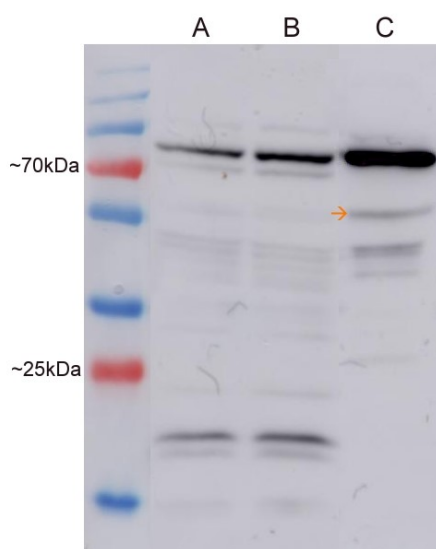
Obrázek 29: Peptidy proteinu DIC6939 identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie. Červeně je zobrazena celá sekvence proteinu DIC6939.

5.7.4.1 Analýza mobility DIC6939 v SDS-PAGE

Při izolaci proteinu DIC6939 s redukčním činidlem DTT se na imunoblotu objevoval band o velikosti přibližně 70 kDa (obrázek 28, oranžové šipky). Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.3.4, protein DIC6939 byl na imunoblotech opakovaně detekován v místech, odpovídajících molekulové hmotnosti přibližně 80 kDa, přestože jeho předpokládaná vypočítaná molekulová hmotnost včetně BAP značky je 71,7 kDa. Hmotnostní spektrometrie ověřila specifitu zobrazovaného proteinu. Zdánlivě vyšší molekulová hmotnost může být způsobena pomalejším putováním proteinu v gelu v důsledku zhoršené schopnosti vazby SDS. To může být způsobeno např. neúplnou denaturací proteinu. Nelze vyloučit ani možnost vazby potenciálního interakčního partneru středního řetězce dyneinu, kupříkladu jednoho z lehkých řetězců, k jehož uvolnění nedošlo při standardní denaturaci vzorku.

Pro determinaci, zda by mohlo docházet k úplné denaturaci či uvolnění interagujícího proteinu v důsledku přidání DTT, či zda lze spíše předpokládat, že je ~70kDa band pouze degradačním produktem proteinu DIC6939 byl navržen pokus, srovnávající vliv několika způsobů denaturace proteinu na vznik ~70kDa bandu.

Z obrázku 30 je patrné, že k pozorování zkoumaného bandu dochází pouze za podmínek shodných s izolací proteinu, uvedených v kapitole 5.7.4. Protože samotné DTT k vizualizaci bandu nevede, lze konstatovat, že se jedná buď o produkt degradace, či o protein k jehož kompletní denaturaci je potřebná kombinace několika faktorů.

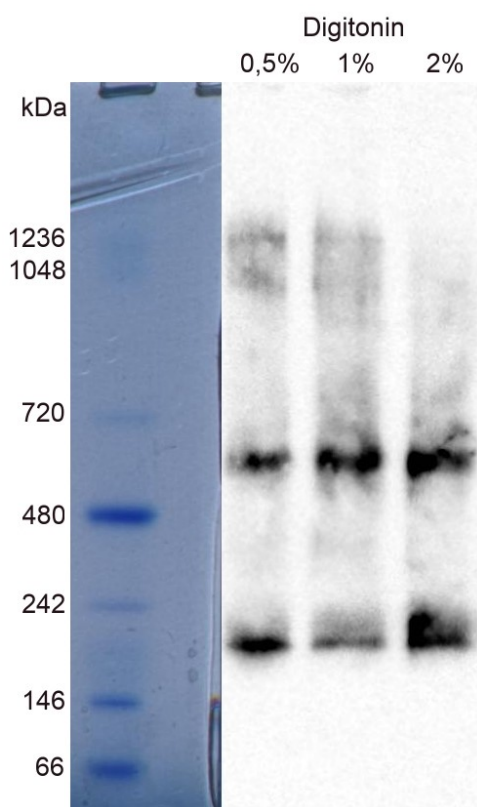


Obrázek 30: Imunoblot byl značen primární králičí α -BAP protilátkou. Vzorek A obsahuje lyzované buňky exprimující DIC6939, inkubované při 95 °C po dobu 10 minut v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru. Vzorek B obsahuje tytéž buňky inkubované za stejných podmínek v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru s přidaným 100mM DTT. Vzorek C byl připraven jako při izolaci, popsané v kapitole 5.7.4, se 100mM DTT a postupnou denaturací. Na imunoblotu je patrné, že ke vzniku pozorovaného bandu (oranžová šipka) došlo pouze ve vzorku C.

5.7.5 Modrá nativní elektroforéza

Modrá nativní elektroforéza byla využita k detekci nativních komplexů proteinů, jejichž součástí je studovaný protein. Tři vzorky tvořené buňkami exprimujícími protein DIC6939 s různou koncentrací digitoninu (0,5%, 1% a 2%) byly separovány v gelu NativePAGE 3-12% Bis-Tris (viz kapitola 4.14.6). Po následném western blotu byly proteinové komplexy na PVDF membráně vizualizovány pomocí primární králičí α -BAP protilátky.

Nativní elektroforézou se podařilo vizualizovat několik proteinových komplexů (obrázek 31). Ve všech vzorcích bylo možné pozorovat dva komplexy o velikosti přibližně 210 kDa a 600 kDa. Ve vzorcích obsahujících 0,5% a 1% digitonin byly navíc vizualizovány komplexy o velikosti přibližně 1040 kDa a 1200 kDa. Z výsledků je zjevné, že se protein DIC6939 v nativním stavu nachází v proteinových komplexech, které pravděpodobně představují zapojení středního řetězce do dyneinového komplexu.



Obrázek 31: Modrá nativní elektroforéza proteinu DIC6939. Komplexy obsahující protein DIC6939 byly značena pomocí primární králičí α -BAP protilátky. Tři analyzované vzorky se liší koncentrací detergentu digitoninu. Ve všech třech vzorcích bylo možné pozorovat komplexy o velikosti přibližně 210 kDa a 600 kDa. Ve vzorcích s 0,5% a 1% digitoninem byly navíc vizualizovány také komplexy o velikosti přibližně 1040 kDa a 1200 kDa.

6 Diskuse

Výzkum mitosomů od jejich objevení v roce 2003 (Tovar et al., 2003) prošel výrazným pokrokem. Byla definována jejich velikost, počet a typická distribuce v buňce. Vizualizace elektronovým mikroskopem umožnila identifikaci dvou membrán, díky čemuž mohlo započít pátrání po proteinech homologních k mitochondriálním membránovým transportérům. Rozsáhlý výzkum mitosomálního proteomu odhalil funkci mitosomu *G. intestinalis* v podobě syntézy železosírných center (Tachezy et al., 2001; Tovar et al., 2003).

Mitosomální proteom byl v minulosti studován především pomocí bioinformatických metod, které umožnily identifikaci homologních proteinů a jejich anotaci. Zprvu byl používán zejména program BLAST, posléze programy využívající skryté Markovovy modely. Bioinformatickou charakterizaci následovalo experimentální ověření získaných informací. Inovativním způsobem studia mitosomálního proteomu nahrazujícím nedostačující bioinformatické metody je snaha o izolaci samotných mitosomů. Rada et al., 2009 a Jedelský et al., 2011 identifikovali nové mitosomální proteiny pomocí gradientové centrifugace a identifikace frakcí, obohacených o známé mitosomální proteiny. Tyto frakce jsou ovšem obvykle kontaminovány velkým množstvím proteinů jiného než mitosomálního původu.

Novým způsobem jak izolovat mitosomální proteiny s výrazně menším podílem kontaminantů je izolace potenciálního interaktomu vybraných proteinů a následná laboratorní a bioinformatická charakterizace objevených proteinů (Martincová et al., 2015; Rout et al., 2016; Pyrihová et al., 2018). Martincová a kolektiv využili chemického crosslinku DSP k provázání blízko ležících proteinů a vysoké afinity streptavidinu k biotinu k následné izolaci komplexů obsahujících studovaný protein s biotinylační značkou a jeho potenciální interaktom. Právě interaktom proteinů Tom40 a MOMP35 z práce Martincové a kolektivu se staly základem pro tuto diplomovou práci.

6.1 Bioinformatická analýza a volba proteinů

Úvodní bioinformatická analýza 40 proteinů získaných izolací s proteiny vnější mitosomální membrány Tom40 a MOMP35 ukázala, že podstatná část izolovaných proteinů (65 %, v datasetu MOMP35 89,5 %) je anotována jako tzv. hypothetical protein, tedy protein neznámé funkce. Jedná se o proteiny, k nimž nejde základními, tedy neoptimalizovanými bioinformatickými metodami přiřadit homologní proteiny. Tyto výsledky věrně odráží stav charakterizace celého genomu *G. intestinalis*. Morrison a kolektiv uvádí, že z 6470 predikovaných otevřených čtecích rámců v genomu *G. intestinalis* byly pouze k přibližně 30 % nalezeny homology v Genbank databázi (Morrison et al., 2007).

U jednotlivých proteinů byly predikovány signální peptidy, napovídající o lokalizaci proteinů v ER, a transmembránové helixy ukazující na jejich membránové ukotvení. V datasetu Tom40 byl predikován u 71,4 % proteinů alespoň jeden transmembránový helix a u 23,8 % signální peptid. U proteinů datasetu MOMP35 bylo pozorováno dramaticky odlišné procentuální zastoupení jednotlivých skupin proteinů (pouze u 1 proteinu byl predikován transmembránový helix a žádný z proteinů neměl signální presekvenci), přestože dle publikovaných studií patří

MOMP35 do interaktomu Tom40 (Martincová et al., 2015; Rout et al., 2016). Zde je nutno zmínit, že součástí této bioinformatické analýzy nebyly proteiny sdílené oběma datasety, neboť ty byly již dříve studovány. Většina sdílených proteinů byla lokalizována do mitosomů (Martincová et al., 2015), je tedy evidentní, že Tom40 a MOMP35 sdílí v rámci mitosomu část svého interaktomu.

Po provedení bioinformatické analýzy byly zvoleny proteiny pro experimentální práci v laboratoři. Vybráno bylo celkem 6 proteinů, u nichž bylo cílem získat stabilní expresi v buňkách *G. intestinalis* a pomocí fluorescenční mikroskopie ověřit jejich buněčnou lokalizaci. Z těchto proteinů měl být následně vybrán jeden kandidát pro podrobnější zkoumání.

Mezi šesti vybranými proteiny byly tři (GL50803_91712, GL50803_96818 a GL50803_31295), které se díky většímu počtu transmembránových helixů (11 – 12) a svým anotacím řadily mezi potenciální membránové transportéry. Jak je uvedeno v kapitole 2.1.3.4, z membránových transportérů vnější membrány je znám pouze Tom40 (Dagley et al., 2009; Jedelský et al., 2011), z vnitřní membrány Tim17 (Pyrihová et al., 2018). Prominentní je absence proteinu Sam50, zodpovědného za vložení proteinu Tom40 do vnější mitochondriální membrány (Dagley et al., 2009; Jedelský et al., 2011; Martincová et al., 2015). Pokud se Sam50 v *G. intestinalis* nachází, může být očekávána jeho přítomnost v interaktomu proteinu Tom40. Velké množství transmembránových domén bylo predikováno také v proteinu GL50803_137685, dle anotace patřícího mezi glykosyltransferázy ER. Ačkoliv bylo prakticky jisté, že tento protein nebude patřit mezi výhradně mitosomální, zajímal nás jeho potenciální podíl na interakci mezi ER a mitosomy.

Dalším z vybraných proteinů byl protein neznámé funkce s GLUG motivem GL50803_114210. Stejně jako předchozí proteiny, i tento byl predikován jako možný membránový protein, ovšem pouze s jedním transmembránovým helixem. Helix se nachází ve vzdálenosti ~50 AK od C-konce proteinu a dle predikce programu TMHMM jeho delší, N-koncová část nesměřuje do cytosolu. Tento protein byl zvolen, neboť byl v datasetu Tom40 jeden z nejvíce obohacených. Zároveň byl v minulosti v naší laboratoři identifikován také izolací s dalším mitosomálním proteinem, GL50803_16424 (Pelc, 2018).

Posledním ze zvolených proteinů byl GL50803_6939, v GiardiaDB anotovaný jako střední řetězec dyneinu. Protože cytoplasmatické dyneiny v eukaryotických buňkách slouží mimo jiné k přesunu mitochondrií po buněčných mikrotubulech (viz. kapitola 2.2.1), zajímalo nás, zda by se mohl tento protein v *G. intestinalis* podílet na transportu mitosomů do míst jejich typické lokalizace (obrázek 2).

6.2 Exprese proteinů a ověření lokalizace v buňce

Úspěšné zaklonování se podařilo u všech konstruktů vyjma GL50803_114210. Jak je uvedeno v kapitole 5.2, nejprve se dařilo amplifikovat pouze polovinu genu, což byl důsledek alternativního nasednutí primeru přibližně uprostřed genu. Po navržení delšího primeru s přidanými bázemi na 3' konci se podařilo gen amplifikovat v plné délce. V následující práci se ovšem ani po opakovaných pokusech nepodařila úspěšná ligace genu do plasmidu. Na základě empirické zkušenosti v naší laboratoři lze konstatovat, že by důvodem mohla být právě značná délka tohoto genu. S 3312 bp byl tento insert nejdelší z klonovaných. Řešením tohoto problému

by mohlo být využití některého z kitů usnadňujících klonování dlouhých genů, případně zakoupení syntetického plasmidu s již vloženým genem. K těmto řešením prozatím nebylo přistoupeno a protein byl z další práce vynechán.

Kromě plasmidů pTG s vybranými geny byl připraven také plasmid pUC57-mini s vloženou cytosolickou biotin ligázou bakterie *E. coli* (BirA) s V5 značkou. Její exprese v buňkách umožňuje organelově specifickou biotinylation proteinů s BAP značkou (Howarth a Ting, 2008). Příprava tohoto plasmidu proběhla bez problémů a také následná transfekce kontrolních buněk nesoucích pouze plasmid BirA byla úspěšná. Expresi BirA se povedlo ověřit pomocí metody western blotu.

Po přípravě plasmidů byly vytvořeny dvojité transfekované buňky *G. intestinalis*, obsahující vždy jeden plasmid pTG s genem našeho zájmu a plasmid pUC57-mini nesoucí gen pro BirA. U takto nachystaných buněk byla ověřována exprese metodou western blot a lokalizace v buňce pomocí fluorescenční mikroskopie.

U tří z pěti studovaných proteinů (GL50803_137685, GL50803_96818 a GL50803_31295) byla pomocí mikroskopie detekována lokalizace do ER. Avšak pouze u jednoho z nich (GL50803_137685) byla pomocí SignalP 4.1 predikována přítomnost signálního peptidu. V případě dvou zbývajících proteinů se zřejmě jedná o proteiny bez signální presekvence.

Protein GL50803_137685 je v databázi GiardiaDB anotován jako oligosacharyl transferáza, která je v eukaryotických buňkách obvykle ukotvena v membráně ER. Jeho přítomnost v interaktomu Tom40 naznačovala možný podíl na interakci mezi ER a mitosomy. Vzhledem k jeho anotaci a distribuci v buňce (obrázek 10) se ovšem nedá předpokládat, že by zprostředkování interakcí mezi organelami bylo jeho primární funkcí. Nelze vyloučit ani možnost, že jde o pouhý kontaminant v důsledku jeho hojnosti v buňce. Při expresi tohoto proteinu byly na imunoblotech pozorovány velké, specificky značené proteinové komplexy. Přítomnost těchto komplexů by mohla být způsobena přítomností velkého počtu transmembránových domén (9) u tohoto proteinu, a tedy jeho obtížné uvolnění z membrány obvyklými denaturačními metodami. Dalším z důvodů by mohly být posttranslační modifikace proteinu, ovlivňující jeho putování v gelu. Pomocí streptavidinového konjugátu byl na imunoblotu vizualizován band o správné velikosti. Konjugát streptavidinu neznačil zmiňované velké proteinové komplexy, nejspíš z důvodu nedostatečného odkrytí biotinu, které by umožnilo navázání streptavidinu.

U proteinu GL50803_96818 byla po celou dobu práce pozorována velice špatná životaschopnost buněk. Po krátké době po transfekci se zřejmě v důsledku overexprese proteinu projevil letální fenotyp a linie vymřela. Po dobu života linie se z buněk podařilo připravit preparát, na němž byla pozorována zmíněná lokalizace do ER, ovšem nepodařilo se získat paralelní imunoblot. Způsobem k získání stabilní linie by mohlo být v budoucnu použití slabšího promotoru. Jelikož jde zřejmě o protein homologní k nukleosidovým transportérům (viz. kapitola 5.1) je možné, že i jen malé zvýšení jeho exprese vede k narušení rovnováhy distribuce nukleosidů v buňce, což vede k její smrti. Ověřit lokalizaci by bylo možné také použitím specifické protilátky proti tomuto proteinu.

V průběhu ověřování exprese proteinu GL50803_31295 byly na imunoblotech pozorovány velké komplexy, stejně jako v případě již zmiňovaného proteinu GL50803_137685. Zde se nabízí stejné vysvětlení, opět jde o protein s velkým počtem predikovaných transmembránových helixů (12), či o protein posttranslačně modifikovaný. U tohoto proteinu se nepodařilo vizualizovat band o správné velikosti pomocí streptavidinového konjugátu. Důvodů může být několik, ať už absence biotinylace z důvodu sbalení BAP značky dovnitř proteinového komplexu, umístění BAP značky mimo cytoplasmu, kde se nachází exprimovaná BirA, či příliš slabá exprese proteinu pro jeho detekci streptavidinem. Způsobem, jak obejít první dva ze zmíněných důvodů by mohlo být vytvoření dalšího konstruktů obsahujícího BAP značku na N-konci proteinu.

Protein GL50803_91712 byl jeden z potenciálních transmembránových transportérů bez signální presekvenční. U tohoto proteinu se nepodařilo ověřit expresi na imunoblotu a na preparátu protein vykazoval lokalizaci, která neodpovídala dosud známým buněčným kompartmentům *G. intestinalis*.

Poslední z proteinů, potenciální střední řetězec dyneinu GL50803_6939 (DIC6939), byl dle imunoblotu silně exprimován a jeho lokalizace na preparátu odpovídala rozmístění bičíků. Protein byl na imunoblotu úspěšně vizualizován také pomocí konjugátu streptavidinu. Buňky nevykazovaly zvláštní fenotyp a byly životaschopné srovnatelně s buňkami divokého typu. Proto byl tento protein vybrán pro další laboratorní charakterizaci.

6.3 Charakterizace proteinu DIC6939 *in silico*

Protein DIC6939 byl programy BlastP a HHpred predikován jako homolog středního řetězce dyneinu. Program Gene Ontology predikoval schopnost proteinu vázat těžký a lehký řetězec, což je obecně schopnost všech středních řetězců dyneinů. Zároveň predikoval možné funkce proteinu – pohyb bičíku, sestavení vnějšího raménka dyneinu a pohyb po mikrotubulárních strukturách. Dyneinové komplexy v buňce existují ve dvou formách – cytoplasmatické a axonemální (viz. kapitola 2.2). První dvě predikované funkce by odpovídaly řetězci axonemálnímu. Třetí lze přiřadit oběma formám dyneinu, jak cytoplasmatické, která pohybem po mikrotubulech přesouvá buněčné náklady, tak axonemální, která jím uvádí do pohybu bičíky. Přímo střední řetězec dyneinu ovšem sám není za pohyb po mikrotubulech zodpovědný, tuto funkci obvykle zastávají těžké řetězce, respektive jejich mikrotubuly vázající doména (obrázek 5) (Koonce, 1997).

Pro spolehlivější zařazení proteinu mezi axonemální či cytoplasmatické dyneiny byla provedena první fylogenetická analýza. Kvůli předpokladům Morrison a kolektivu (Morrison et al., 2007) o úplné absenci cytoplasmatických dyneinů v *G. intestinalis* jsme se rozhodli zařadit do analýzy všechny doposud objevené střední řetězce dyneinu – kromě DIC6939 také GL50803_33218 a GL50803_10254. Z provedené analýzy jasně vyplývá, že všechny tři dyneiny fylogeneticky spadají pod axonemální dyneiny (obrázek 15). Pokud nedošlo v průběhu evoluce k dramatické změně funkce některého z nich, dá se předpokládat, že se i nadále podílí na funkci axonemálních dyneinových komplexů a v *G. intestinalis* tak nebyl odhalen žádný střední řetězec, který by patřil do cytoplasmatického komplexu.

Dalším krokem bylo srovnání struktury DIC6939 s lidským axonemálním středním řetězcem dyneinu. Z obrázku je jasně patrné, že pokud se predikce blíží skutečnosti, oba proteiny zaujímají velmi podobnou konformaci. Naopak zobrazený lidský cytoplasmatický střední řetězec dyneinu se evidentně liší. Oba druhy dyneinů sdílí vrtulové domény, tvořené C-koncovou částí proteinů. Vrtulové domény jsou v dyneinech obvykle tvořeny WD repeticemi. Ty byly v sekvenci DIC6939 predikovány pomocí softwaru InterPro, který jich odhalil celkem pět, což odpovídá WD repeticím v homologním proteinu *C. reinhardtii* (Wilkerson et al., 1995). WD domény se ovšem nenachází na N-konci tohoto proteinu, přesto je možné i na tomto konci pozorovat vrtulovou strukturu. N-konec cytoplasmatického dyneinu vrtulovou strukturu netvoří, ale je rozvolněnější a obsahuje několik helixů.

Jelikož dle předchozích bioinformatických predikcí DIC6939 zjevně spadá pod axonemální dyneiny, dalším cílem bylo zařadit tento protein (a oba další střední řetězce dyneinů *G. intestinalis*) mezi konkrétní skupiny axonemálních dyneinů. Nomenklatura středních řetězců dyneinu není mezi organismy ustálená, takže mnohdy není na první pohled poznat, které dyneiny patří do stejné skupiny. Přesto se již dají najít skupiny dyneinů, jejichž evoluční konzervovanost byla studiemi potvrzena (King et al., 1990; Ogawa et al., 1995). V této práci byla při analýze použita nomenklatura středních řetězců zelené řasy *C. reinhardtii* ze dvou důvodů. Prvním důvodem je fakt, že *C. reinhardtii* je jeden z modelových organismů pro studium dyneinů, jeho dyneiny jsou proto dobře popsány a existuje o nich velká řada publikací. Druhým důvodem je přítomnost pěti různých druhů středních řetězců dyneinu, dobře zařazených mezi vnitřní a vnější raménka dyneinových komplexů.

Fylogenetická analýza zařadila DIC6939 mezi IC70, což je skupina dyneinů vnějšího raménka (obrázek 18). Dynein GL50803_33218 spadal mezi IC78, taktéž dyneiny vnějšího raménka. Pokud je způsob sestavení axonemálních dyneinových komplexů u *G. intestinalis* konzervován, jsou tyto dva proteiny s nejvyšší pravděpodobností interakčními partnery. Zařazení těchto dvou proteinů koresponduje s fylogenetickým zařazením v práci Wickstead and Gull, 2007. Třetí protein, GL50803_10254 zřetelně nespadal pod žádnou z vytvořených fylogenetických skupin. Pro jeho zařazení by v budoucnu mohlo pomoci přidání širšího spektra dyneinů od dalších organismů, neboť je možné, že tento dynein spadá do jiné skupiny středních řetězců, která se u *Chlamydomonas* nevyskytuje.

Alignment DIC6939 s proteiny patřícími do skupiny IC70 ukázal výraznou sekvenční podobnost. Tento protein byl nejdelší z vybraných sekvencí kvůli několika dlouhým insercím v genu, které se nenacházely v žádném z dalších tří proteinů.

6.4 Ověření kolokalizace DIC6939 a mitosomů

Jedním z experimentálních důkazů, že by se DIC6939 mohl podílet na transportu mitosomů v *G. intestinalis* by byl mikroskopický důkaz kolokalizace proteinu a mitosomu. Pro ověření této skutečnosti byly vytvořeny preparáty, kde byl označen jak DIC6939, tak mitosomální protein Tom40. Kvůli nízkému rozlišení „widefield“ mikroskopu bylo přistoupeno k použití superrezoluční mikroskopie. Na snímku ze STED mikroskopu byly dobře pozorovatelné centrální i periferní mitosomy a lokalizace proteinu DIC6939. Na první pohled nebyla vidět jasná

kolokalizace těchto struktur. V posteriorní části buňky a oblasti centrálních mitosomů bylo možné pozorovat blízkost těchto struktur v rámci buňky, nelze však s jistotou konstatovat, zda jde o skutečný kontakt. Tento problém by bezpochyby více osvětlila izolace interakčních partnerů DIC6939.

6.5 Izolace interaktomu DIC6939

Jedním z hlavních cílů byla identifikace potenciálního interaktomu proteomu DIC6939 pomocí chemického crosslinku a imunoafinitní purifikace (Tang and Bruce, 2009). Metodologie v mé práci byla založená na metodologii v publikaci Martincová et al., 2015. Základem této metody byly dva klíčové prvky. Prvním je koexprese vybraného proteinu s BAP značkou a biotin ligázy (BirA). Díky této koexpresi dochází k biotinylosti BAP značky. Imunoblot značený fluorescenčním konjugátem streptavidinu prokázal, že dochází k biotinylosti DIC6939. Druhým důležitým prvkem je provázání blízko ležících proteinů chemickým crosslinkerem a optimalizace jeho správné koncentrace tak, aby došlo pouze k provázání proteinů blízko ležících. Kvůli snaze o získání tzv. reverzního interaktomu (Rout et al., 2016), tedy opětovného nalezení proteinu Tom40 v interaktomu DIC6939, bylo vhodné využít stejný crosslinker jako v práci Martincové a kolektivu, tedy dithiobis(succinimidyl propionát) (DSP). Testem byla určená optimální koncentrace crosslinkeru 250 μ M.

Po otestování biotinylosti a určení optimální koncentrace crosslinkeru bylo možné provést crosslinkování buněk a izolovat komplexy obsahující DIC6939 pomocí afinity biotinu ke streptavidinu, navázanému na magnetické kuličky. Po provedení izolace proteinů dle standardního protokolu se na imunoblotu ukázalo, že nedošlo k navázání proteinového komplexu na kuličky. Ověření biotinylosti ukázalo, že ve všech frakcích získaných při izolaci je protein biotinylován.

Jako možný problém se jevílo ukrytí biotinylované BAP značky uvnitř provázaného komplexu, proto byla provedena izolace bez přidání crosslinkeru. Výsledek byl stejný jako u standardního protokolu, což naznačovalo, že se protein na kuličky neváže ani za nativních podmínek. Přistoupili jsme proto k pokusu o izolaci za redukujících podmínek s přidáním 100mM DTT. Při přidávání redukčního činidla po celý průběh pokusu došlo k navázání proteinu a jeho identifikaci v poslední frakci. Protein byl přítomen také v nenavázaném materiálu, což značí, že nedošlo k úplnému navázání proteinu. Analýza navázaných proteinů hmotnostní spektrometrií prokázala specifickou vazbu proteinu DIC6939 na magnetické kuličky. Důvodem navázání proteinu na kuličky při izolaci provedené za redukujících podmínek by mohlo být rozrušení vnitřní disulfidické vazby, které umožní kontakt biotinu se streptavidinem.

Velkým problémem pro další práci byl fakt, že používaný crosslinker tvoří disulfidické vazby, které by byly přidáním DTT rozrušeny. Nejvíce se délkou a vlastnostmi blíží redukčním činidlem nerozrušitelný crosslinker disukcinimidyl suberát (DSS). Kvůli jeho nedostupnosti v naší laboratoři a časovému omezení nebylo v průběhu této práce k izolaci s DSS přistoupeno. Alternativním řešením by mohla být exprese DIC6939 s BAP značkou na N-konci proteinu a ověření, zda je v tomto případě biotin dostatečně odkryt i za neredukujících podmínek.

6.6 DIC6939 v nativních komplexech

Vnější raménka axonemálních dyneinů jsou komplexy proteinů, které společně s vnitřními raménky zajišťují pohyb buněčných bičků. Jsou tvořeny přinejmenším třemi druhy dyneinů, jejichž zastoupení je závislé na druhu organismu. Těžké řetězce jsou v komplexu obvykle dva či tři, středních je mezi dvěma a pěti a lehkých řetězců je obvykle vyšší počet (například u *Chlamydomonas* jich bylo dosud objeveno 11) (Gatti et al., 1989). Na rozdíl od cytoplasmatických dyneinů, pro něž jsou typické homodimery jednotlivých druhů proteinů (Reck-Peterson et al., 2018), u axonemálních jsou některé proteiny obvykle zastoupeny pouze jednou (Piperno et al., 1990).

Díky naprostému nedostatku informací o dyneinech *G. intestinalis* není jasné, s kolika a s kterými proteiny by měl DIC6939 interagovat. U *Chlamydomonas* tvoří střední řetězec dyneinu IC70, homolog proteinu DIC6939, heterodimer s dyneinem IC78 (Mitchell and Rosenbaum, 1986; King et al., 1991). Zatímco IC78 je zodpovědný za vazbu komplexu k mikrotubulům (King et al., 1991), IC70 vaznou doménu postrádá a plní funkci při sestavování komplexů (Mitchell and Kang, 1991) a při regulaci jejich funkce (Mitchell and Kang, 1993). Heterodimer středních řetězců na sebe váže lehké řetězce. Studium dyneinů pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) popsalo pevnou asociaci IC78 (IC1) a IC70 (IC2) s lehkými řetězci LC2, LC3, LC4 a LC6 (King et al., 1990). Protože nejsou u *G. intestinalis* známy homologы těchto lehkých řetězců, nelze s jistotou odhadnout jejich molekulovou hmotnost. Jak napověděl alignment proteinů IC70, DIC6939 byl kvůli insercím téměř o 50 AK delší než dyneiny *Chlamydomonas* a *Oncorhynchus*.

Pomocí modré nativní elektroforézy byly identifikovány komplexy čtyř velikostí obsahující DIC6939 – ~210 kDa, ~600 kDa, ~1040 kDa a ~1200 kDa. Nejmenší komplex by mohl odpovídat heterodimeru středních řetězců (~150 kDa) s navázanými lehkými řetězci. U dvou největších komplexů se nabízí interakce s těžkými řetězci dyneinu, jejichž molekulová hmotnost je obvykle přibližně 500 kDa. Protože však nejsou známy konkrétní těžké řetězce asociované s vnějšími raménky, či jejich velikost, nelze to konstatovat s jistotou. Komplex o velikosti ~600 kDa by odpovídal komplexu β -těžkého řetězce, IC70 a 18 kDa lehkého řetězce, pozorovaného v publikaci Mitchell and Rosenbaum, 1986. Dalšími proteiny, které by bylo možné nalézt v asociaci s DIC6939 jsou proteiny tzv. dokovacího komplexu či součásti již zmiňovaného OID linkeru, zajišťujícího kontakt mezi vnějším a vnitřním raménkem dyneinu (Oda et al., 2013). Dokovací komplex je heterotrimer proteinů, u *C. reinhardtii* o velikosti ~83 kDa, ~62 kDa a ~21 kDa (Takada et al., 2002), který se podílí na ukotvení dyneinového komplexu k mikrotubulům. Jeho asociace se středními řetězci vnějšího raménka byla studiemi potvrzena (Ide et al., 2013). Složení OID linkeru i dokovacího komplexu je u *G. intestinalis* úplně neprozkoumané.

6.7 Shrnutí

Mohl by se tedy DIC6939 podílet na transportu mitosomů v *G. intestinalis*?

Podle většiny informací získaných jeho studiem je odpověď spíše negativní. Bioinformatické nástroje poměrně s jistotou zařazují tento protein mezi axonemální dyneiny IC70. Ty se jak lokalizací v buňce, tak predikovanou strukturou výrazně liší od cytoplasmatických dyneinů, je tedy nepravděpodobné, že by byly schopny transportovat cytoplasmatické náklady. Superrezoluční mikroskopie neprokázala možnou kolokalizaci DIC6939 s proteinem Tom40. Reverzní izolaci objasňující zda se Tom40 váže na DIC6939 při izolaci jeho interaktomu se v rámci této práce nepodařilo provést. Podařilo se ovšem popsat podmínky, při nichž se izolace daří, byla tedy připravena půda pro budoucí práci. Izolace potenciálního interaktomu by také pomohla objasnit, které proteiny jsou součástí nativních komplexů vizualizovaných modrou nativní elektroforézou.

Kromě charakterizace proteinu DIC6939 se v této práci také podařilo zařadit dva další střední řetězce dyneinu *G. intestinalis* mezi axonemální dyneiny. To koresponduje s tvrzením Morrison et al., 2007, že *G. intestinalis* chybí komplexy cytoplasmatických dyneinů. Absence některého druhu dyneinového komplexu není v rámci eukaryotické říše unikátem *G. intestinalis*. Dyneinové komplexy totiž úplně chybí krytosemenným rostlinám, červeným řasám a parazitovi *Entamoeba histolytica* (Wickstead and Gull, 2007).

Jak tedy dochází k transportu mitosomů do míst jejich charakteristické lokalizace? Je třeba si uvědomit, jak tato lokalizace vypadá. Centrální mitosomy se nachází v centru buňky v blízkosti bazálních tělísek bičků. Některá z těchto bazálních tělísek pravděpodobně plní funkci organizačního centra mikrotubulů (microtubule organizing center, MTOC) (Sagolla et al., 2006), z nichž vychází mikrotubuly do prostoru buňky. V eukaryotických organismech se v MTOC většinou nachází mínus konec mikrotubulů, kdežto plusový konec je na periférii buňky. Cytoplasmatický dynein kráčí směrem k mínus konci, sloužil by tedy k transportu mitosomů mezi jádra. Publikované práce ovšem naznačují, že centrální mitosomy jsou pravděpodobně pevně ukotveny vazbou k bazálním tělískům a není proto třeba je transportovat (Regoes et al., 2005; Voleman et al., 2017).

V případě periferních mitosomů by transport zřejmě nemohl být zajišťován dyneiny, nýbrž jinými komplexy molekulových motorů. K plusovému konci mikrotubulů kráčí komplexy motorů kinesinů. Jak naznačuje práce Morrison et al., 2007, kinesinů se v *G. intestinalis* nachází celá řada. Jejich asociace s mitosomy ovšem nebyla popsána. Je třeba zmínit také možnost, že k transportu mitosomů jednoduše vůbec nedochází. V práci Voleman et al., 2017 bylo pozorováno dělení mitosomů podél cisteren ER, nabízí se tedy možnost, že mitosomy udržuje v místě lokalizace jejich asociace s ER a při dělení buňky jsou nové mitosomy pouze přesunuty společně s ER. Tak by mohla být jejich lokalizace v *G. intestinalis* konzervována.

Předmětem budoucího výzkumu bezpochyby zůstává další charakterizace dyneinů *G. intestinalis*. Nezodpovězenou otázkou, která vzešla z výzkumu v této práci je zařazení středního řetězce dyneinu GL50803_10254 mezi dyneiny vnějšího/vnitřního raménka. Velkou mezerou je absence charakterizace jednotlivých dyneinových komplexů a popis jejich architektury v buňkách *G. intestinalis*.

7 Závěr

Cílem této práce bylo blíže charakterizovat proteiny nalezené v interaktomu proteinů vnější mitosomální membrány *G. intestinalis*. Celkem 40 proteinů z interaktomu Tom40 a MOMP35 bylo bioinformaticky charakterizováno z hlediska jejich predikované funkce, možné lokalizace a částečně také membránové topologie. Ze šesti proteinů vybraných pro experimentální práci se pět podařilo vložit do expresních vektorů. U čtyř se povedlo pomocí fluorescenční mikroskopie určit jejich lokalizaci, tři se podařilo lokalizovat do ER, jeden do bičíkových struktur.

Pro podrobnou charakterizaci byl vybrán střední řetězec dyneinu DIC6939, jenž byl zajímavý kvůli možnému podílu na transportu mitosomů. Fylogenetickými analýzami byl ovšem zařazen do skupiny IC70 axonemálních dyneinů, které se podílí na pohybu bičíků, nikoliv na transportu buněčných nákladů. Také jeho predikovaná 3D struktura odpovídala axonemálním dyneinům. Superrezoluční mikroskopie nepotvrdila kolokalizaci tohoto proteinu s miosomálním proteinem. Analýza ukázala, že je vystaven degradaci cytoplasmatickým trypsinem, ale při extrakci uhličitánem sodným nedochází k jeho uvolnění z mikrotubulů.

V rámci této práce se kvůli metodologickým komplikacím nepodařilo izolovat interaktom proteinu DIC6939, podařilo se ovšem eliminovat problémy a popsat podmínky, při nichž dochází k vazbě proteinu na streptavidinem pokryté magnetické kuličky. Zároveň byla pomocí hmotnostní spektrometrie ověřena specifita vazby studovaného proteinu na kuličky. Byla proto připravena půda pro budoucí izolaci. Z modré nativní elektroforézy proteinu DIC6939 je evidentní, že je v nativním stavu součástí komplexů o čtyřech různých velikostech. Z charakteru proteinu lze předpokládat, že jde o proteiny podílející se na pohybu bičíků.

8 Seznam použitých zkratk

AK	aminokyselina
BAP	„biotin acceptor peptide“
BirA	biotin ligáza
DIC6939	GL50803_6939, „dynein intermediate chain“, střední řetězec dyneinu
DMSO	dimetylsulfoxid
DSP	dithiobis(succinimidyl propionát)
DTT	dithiotreitol
ER	endoplasmatické retikulum
HA	hemaglutinin
IAD	„inner arm dynein“, vnitřní raménko dyneinu
IC	„intermediate chain“, střední řetězec dyneinu
Isc	železosirný klastr/centrum
IscS	cystein desulfuráza
IscU	enzym skládající železosirná centra
LEU	leupeptin
MROs	mitochondrii-příbuzné organely
MTOC	„microtubule organizing center“, organizační centrum mikrotubulů
OAD	„outer arm dynein“, vnější raménko dyneinu
OID	„outer-inner dynein“, linker vnějšího a vnitřního raménka dyneinu
PBS	fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PV	periferní vakuoly
SDS	dodecylsírán sodný
Str488	konjugát streptavidinu a Alexa Fluor 488
TLCK	N-tosyl-L-lysin chlormetyl keton
VSP	variantní povrchový protein

9 Literatura

- Abodeely, M., DuBois, K. N., Hehl, A., Stefanic, S., Sajid, M., DeSouza, W., Attias, M., Engel, J. C., Hsieh, I., Fetter, R. D., et al. (2009). A contiguous compartment functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia lamblia*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1665–1676.
- Adam, R. D., Nigam, A., Seshadri, V., Martens, C. A., Farneth, G. A., Morrison, H. G., Nash, T. E., Porcella, S. F. and Patel, R. (2010). The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics* **11**, 424.
- Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R. and Johnson, M. K. (2000). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**, 7856–62.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. and Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 413–422.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **25**, 25–29.
- Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carlton, J. M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., et al. (2009). GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res.* **37**, D526–D530.
- Bradley, J. L., Blake, J. C., Chamberlain, S., Thomas, P. K., Cooper, J. M. and Schapira, A. H. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 275–82.
- Brugerolle, G. (1975). Ultrastructure of the genus *Enteromonas* da Fonseca (Zoomastigophorea) and revision of the order of Diplomonadida Wenyon. *J. Protozool.* **22**, 468–75.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–7.
- Carpenter, M. L. and Cande, W. Z. (2009). Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell* **8**, 916–919.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* **57**, 953–94.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 297–354.
- Dacks, J. B., Marinets, A., Ford Doolittle, W., Cavalier-Smith, T. and Logsdon, J. M. (2002). Analyses of RNA polymerase II genes from free-living protists: phylogeny, long branch attraction, and the eukaryotic Big bang. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 830–840.
- Dagley, M. J., Dolezal, P., Likic, V. A., Smid, O., Purcell, A. W., Buchanan, S. K., Tachezy, J. and Lithgow, T. (2009). The protein import channel in the outer mitochondrial membrane of *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1941–1947.
- Dan, M., Wang, A. L. and Wang, C. C. (2000). Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme. *Mol. Microbiol.* **36**, 447–56.
- Ding, H. and Clark, R. J. (2004). Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem. J.* **379**, 433–40.

- Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubacova, Z., Bursac, D., Sutak, R., Nebesarova, J., Lithgow, T. and Tachezy, J. (2005). Giardia mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 10924–10929.
- Elias, E. V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T. E., Neiman, A. and Lujan, H. D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35996–36010.
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. and McCaffery, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* **33**, 3–28.
- Embley, T. M. and Hirt, R. P. (1998). Early branching eukaryotes? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 624–9.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., et al. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **42**, D222–30.
- Gargantini, P. R., Serradell, M. del C., Ríos, D. N., Tenaglia, A. H. and Luján, H. D. (2016). Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr. Opin. Microbiol.* **32**, 52–58.
- Gatti, J. L., King, S. M., Moss, A. G. and Witman, G. B. (1989). Outer arm dynein from trout spermatozoa. Purification, polypeptide composition, and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 11450–7.
- Gibbons, I. R. (1963). Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 1002–10.
- Gibbons, I. R. and Rowe, A. J. (1965). Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science (80-)*. **149**, 424–426.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321.
- Hanevik, K., Dizdar, V., Langeland, N. and Hausken, T. (2009). Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol.* **9**, 27.
- Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Shirakura, T., Adachi, J., Goto, N., Okamoto, K. and Hasegawa, M. (1994). Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 65–71.
- Hashimoto, T., Sánchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M. and Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6860–5.
- Holberton, D. V (1973). Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell Sci.* **13**, 11–41.
- Howarth, M. and Ting, A. Y. (2008). Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat. Protoc.* **3**, 534–545.
- Humphries, A. D., Streimann, I. C., Stojanovski, D., Johnston, A. J., Yano, M., Hoogenraad, N. J. and Ryan, M. T. (2005). Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. *J. Biol. Chem.* **280**, 11535–11543.
- Ide, T., Owa, M., King, S. M., Kamiya, R. and Wakabayashi, K. (2013). Protein-protein interactions between intermediate chains and the docking complex of *Chlamydomonas* flagellar outer arm dynein. *FEBS Lett.* **587**, 2143–2149.
- Jedelský, P. L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A. J., et al. (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* **6**, e17285.

- Kabnick, K. S. and Peattie, D. A.** (1990). In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* **95** (Pt 3), 353–60.
- Kamikawa, R., Inagaki, Y., Tokoro, M., Roger, A. J. and Hashimoto, T.** (2011). Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. *Curr. Biol.* **21**, 311–315.
- Kamiya, R.** (2002). Functional diversity of axonemal dyneins as studied in *Chlamydomonas* mutants. *Int. Rev. Cytol.* **219**, 115–55.
- Kardon, J. R. and Vale, R. D.** (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 854–865.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L. D., Herman, E. K., et al.** (2016). A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Curr. Biol.* **26**, 1274–1284.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., et al.** (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**, 450–453.
- Keister, D. B.** (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 487–8.
- King, S. M., Gatti, J.-L., Moss, A. G. and Witman, G. B.** (1990). Outer-arm dynein from trout spermatozoa: Substructural organization. *Cell Motil. Cytoskeleton* **16**, 266–278.
- King, S. M., Wilkerson, C. G. and Witman, G. B.** (1991). The Mr 78,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein interacts with alpha-tubulin in situ. *J. Biol. Chem.* **266**, 8401–7.
- King, S. J., Brown, C. L., Maier, K. C., Quintyne, N. J. and Schroer, T. A.** (2003). Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* **14**, 5089–5097.
- Koonce, M. P.** (1997). Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J. Biol. Chem.* **272**, 19714–8.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. .** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
- Kunz, S., Balmer, V., Sterk, G. J., Pollastri, M. P., Leurs, R., Müller, N., Hemphill, A. and Spycher, C.** (2017). The single cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase of the intestinal parasite *Giardia lamblia* represents a potential drug target. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005891.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., de Carvalho, T. M. ., Kattenbach, W. M. and De Souza, W.** (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J. Struct. Biol.* **123**, 225–235.
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Torres-Escobar, A., Birkeland, S. R., Cipriano, M. J., Preheim, S. P., Palm, D., Svärd, S. G., McArthur, A. G. and Gillin, F. D.** (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**, 80–89.
- Leipe, D. D., Gunderson, J. H., Nerad, T. A. and Sogin, M. L.** (1993). Small subunit ribosomal RNA+ of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 41–8.
- Lill, R.** (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838.
- Lindmark, D. G.** (1980). Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**, 1–12.

- Lloyd, D. and Harris, J. C. (2002). *Giardia*: highly evolved parasite or early branching eukaryote? *Trends Microbiol.* **10**, 122–7.
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Rufino-González, Y., Ortega-Cuellar, D., Sierra-Palacios, E., Vanoye-Carlo, A., González-Valdez, A., Torres-Arroyo, A., Oria-Hernández, J., et al. (2017). RNAi-mediated specific gene silencing as a tool for the discovery of new drug targets in *Giardia lamblia*; evaluation using the NADH oxidase gene. *Genes (Basel)*. **8**, 303.
- Martincová, E., Voleman, L., Najdová, V., De Napoli, M., Eshar, S., Gualdron, M., Hopp, C. S., Sanin, D. E., Tembo, D. L., Van Tyne, D., et al. (2012). Live imaging of mitochondria and hydrogenosomes by HaloTag technology. *PLoS One* **7**, e36314.
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolísko, M., Tachezy, J. and Doležal, P. (2015). Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitochondria using in vivo enzymatic tagging. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2864–2874.
- McArthur, A. G., Morrison, H. G., Nixon, J. E. J., Passamaneck, N. Q. E., Kim, U., Hinkle, G., Crocker, M. K., Holder, M. E., Farr, R., Reich, C. I., et al. (2000). The *Giardia* genome project database. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 271–273.
- McInally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K. and Dawson, S. C. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Mol. Biol. Cell* **30**, 119–130.
- Melkov, A., Baskar, R., Alcalay, Y. and Abdu, U. (2016). A new mode of mitochondrial transport and polarized sorting regulated by Dynein, Milton and Miro. *Development* **143**, 4203–4213.
- Meng, T. C., Aley, S. B., Svard, S. G., Smith, M. W., Huang, B., Kim, J. and Gillin, F. D. (1996). Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**, 103–8.
- Mitchell, D. R. and Kang, Y. (1991). Identification of *oda6* as a *Chlamydomonas* dynein mutant by rescue with the wild-type gene. *J. Cell Biol.* **113**, 835–42.
- Mitchell, D. R. and Kang, Y. (1993). Reversion analysis of dynein intermediate chain function. *J. Cell Sci.* **105** (Pt 4), 1069–78.
- Mitchell, D. R. and Rosenbaum, J. L. (1986). Protein-protein interactions in the 18S ATPase of *Chlamydomonas* outer dynein arms. *Cell Motil. Cytoskeleton* **6**, 510–520.
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., et al. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **47**, D351–D360.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2003). Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 4945–4956.
- Morrison, H. G., Roger, A. J., Nystul, T. G., Gillin, F. D. and Sogin, M. L. (2001). *Giardia lamblia* expresses a proteobacterial-like DnaK homolog. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 530–541.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., et al. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science (80-)*. **317**, 1921–1926.
- Nash, T. E., Merritt, J. W. and Conrad, J. T. (1991). Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect. Immun.* **59**, 1334–40.
- Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with SignalP. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 59–73.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1–6.
- Nohýnková, E., Tůmová, P. and Kulda, J. (2006). Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryot. Cell* **5**, 753–761.
- Oda, T., Yagi, T., Yanagisawa, H. and Kikkawa, M. (2013). Identification of the outer-inner dynein linker as a hub controller for axonemal dynein activities. *Curr. Biol.* **23**, 656–664.
- Ogawa, K., Kamiya, R., Wilkerson, C. G. and Witman, G. B. (1995). Interspecies conservation of outer arm dynein intermediate chain sequences defines two intermediate chain subclasses. *Mol. Biol. Cell* **6**, 685–96.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S. and Duchen, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–23.
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almagbrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., et al. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* **36**, W163–9.
- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winiecka-Krusnell, J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Pacocha, S. E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., et al. (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **141**, 199–207.
- Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. and Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862–866.
- Pelc, J. (2018). *Studium nově objeveného proteinu GL50803_16424 u Giardia intestinalis*. Praha, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- Perry, A. J., Rimmer, K. A., Mertens, H. D. T., Waller, R. F., Mulhern, T. D., Lithgow, T. and Gooley, P. R. (2008). Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 265–274.
- Piperno, G., Ramanis, Z., Smith, E. F. and Sale, W. S. (1990). Three distinct inner dynein arms in *Chlamydomonas* flagella: molecular composition and location in the axoneme. *J. Cell Biol.* **110**, 379–89.
- Piva, B. and Benchimol, M. (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol. Cell* **96**, 735–746.
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G. and Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* **456**, 750–754.
- Putignani, L., Tait, A., Smith, H. V., Horner, D., Tovar, J., Tetley, L. and Wastling, J. M. (2004). Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* **129**, 1–18.
- Pyrih, J., Pyrihová, E., Kolísko, M., Stojanovová, D., Basu, S., Harant, K., Haindrich, A. C., Doležal, P., Lukeš, J., Roger, A., et al. (2016). Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes. *Mol. Microbiol.* **102**, 701–714.
- Pyrihová, E., Motyčková, A., Voleman, L., Wandyszewska, N., Fišer, R., Seydlová, G., Roger, A., Kolísko, M. and Doležal, P. (2018). A single Tim translocase in the mitosomes of *Giardia intestinalis* illustrates convergence of protein import machines in anaerobic eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* **10**, 2813–2822.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. and Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–1183.

- Rada, P., Šmíd, O., Sutak, R., Doležal, P., Pyrih, J., Žárský, V., Montagne, J.-J., Hrdý, I., Camadro, J.-M. and Tachezy, J. (2009). The monothiol single-domain glutaredoxin is conserved in the highly reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1584–1591.
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D. and Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 382–398.
- Regoes, A., Zourmanou, D., León-Avila, G., van der Giezen, M., Tovar, J. and Hehl, A. B. (2005). Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **280**, 30557–30563.
- Riordan, C. E., Ault, J. G., Langreth, S. G. and Keithly, J. S. (2003). *Cryptosporidium parvum* Cpn60 targets a relict organelle. *Curr. Genet.* **44**, 138–147.
- Rivero, M. R., Kulakova, L. and Touz, M. C. (2010). Long double-stranded RNA produces specific gene downregulation in *Giardia lamblia*. *J. Parasitol.* **96**, 815–819.
- Roger, A. J., Svärd, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D. and Sogin, M. L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 229–34.
- Rout, S., Zumthor, J. P., Schraner, E. M., Faso, C. and Hehl, A. B. (2016). An interactome-centered protein discovery approach reveals novel components involved in mitosome function and homeostasis in *Giardia lamblia*. *PLOS Pathog.* **12**, e1006036.
- Rowland, A. A. and Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–615.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738.
- Roy, S. W., Hudson, A. J., Joseph, J., Yee, J. and Russell, A. G. (2012). Numerous fragmented spliceosomal introns, AT-AC splicing, and an unusual dynein gene expression pathway in *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 43–49.
- Sagolla, M. S., Dawson, S. C., Mancuso, J. J. and Cande, W. Z. (2006). Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J. Cell Sci.* **119**, 4889–4900.
- Santos, H. J., Makiuchi, T. and Nozaki, T. (2018). Reinventing an organelle: the reduced mitochondrion in parasitic protists. *Trends Parasitol.* **34**, 1038–1055.
- Saxton, W. M. and Hollenbeck, P. J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* **125**, 2095–2104.
- Schilke, B. A., Hayashi, M. and Craig, E. A. (2012). Genetic analysis of complex interactions among components of the mitochondrial import motor and translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 1341–53.
- Simpson, A. G. B. (2003). Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1759–1777.
- Singer, S. M., Yee, J. and Nash, T. E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 59–69.
- Šmíd, O., Matušková, A., Harris, S. R., Kučera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutěřová, E., Hirt, R. P., Embley, T. M., et al. (2008). Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. *PLoS Pathog.* **4**, e1000243.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 181–5.
- Soding, J., Biegert, A. and Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**, W244–W248.

- Soltys, B. J. and Gupta, R. S.** (1994). Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial hsp60 in *Giardia lamblia*. *J. Parasitol.* **80**, 580–90.
- Soltys, B. J., Falah, M. and Gupta, R. S.** (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 7), 1909–17.
- Sun, C. H., Chou, C. F. and Tai, J. H.** (1998). Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 123–32.
- Tachezy, J., Sánchez, L. B. and Müller, M.** (2001). Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1919–1928.
- Takada, S., Wilkerson, C. G., Wakabayashi, K., Kamiya, R. and Witman, G. B.** (2002). The outer dynein arm-docking complex: composition and characterization of a subunit (Oda1) necessary for outer arm assembly. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1015–1029.
- Tang, X. and Bruce, J. E.** (2009). Chemical cross-linking for protein–protein interaction studies. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 283–293.
- The Gene Ontology Consortium** (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **47**, D330–D338.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–80.
- Tovar, J., Fischer, A. and Clark, C. G.** (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1013–21.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. and Lucocq, J. M.** (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**, 172–6.
- Tůmová, P., Hofštetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O. and Král, J.** (2007). Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* **116**, 65–78.
- Tůmová, P., Uzlíková, M., Jurczyk, T. and Nohýnková, E.** (2016). Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiologyopen* **5**, 560–74.
- UniProt Consortium, T.** (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2699–2699.
- van der Giezen, M. and Tovar, J.** (2005). Degenerate mitochondria. *EMBO Rep.* **6**, 525–530.
- van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M. A., van den Heuvel, D. J., Kuijpers, M., Wulf, P. S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L. C., et al.** (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron* **77**, 485–502.
- Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E. and Barras, F.** (2009). Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers. *PLoS Genet.* **5**, e1000497.
- Voleman, L., Najdrová, V., Ástvaldsson, Á., Tůmová, P., Einarsson, E., Švindrych, Z., Hagen, G. M., Tachezy, J., Svärd, S. G. and Doležal, P.** (2017). *Giardia intestinalis* mitosomes undergo synchronized fission but not fusion and are constitutively associated with the endoplasmic reticulum. *BMC Biol.* **15**, 27.
- Wampfler, P. B., Faso, C. and Hehl, A. B.** (2014). The Cre/loxP system in *Giardia lamblia*: genetic manipulations in a binucleate tetraploid protozoan. *Int. J. Parasitol.* **44**, 497–506.

- Wickstead, B. and Gull, K.** (2007). Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic* **8**, 1708–1721.
- Wilchek, M. and Bayer, E. A.** (1990). Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.* **184**, 5–13.
- Wilkerson, C. G., King, S. M., Koutoulis, A., Pazour, G. J. and Witman, G. B.** (1995). The 78,000 M(r) intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein is a WD-repeat protein required for arm assembly. *J. Cell Biol.* **129**, 169–78.
- Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. and Embley, T. M.** (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**, 865–869.
- Yang, J. and Zhang, Y.** (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43**, W174–81.
- Yoon, T. and Cowan, J. A.** (2003). Iron–sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe–2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078–6084.
- Zamponi, N., Zamponi, E., Mayol, G. F., Lanfredi-Rangel, A., Svärd, S. G. and Touz, M. C.** (2017). Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. *Traffic* **18**, 604–621.
- Zhang, Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.
- Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.-Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A. N. and Alva, V.** (2018). A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J. Mol. Biol.* **430**, 2237–2243.
- Zumthor, J. P., Cernikova, L., Rout, S., Kaech, A., Faso, C. and Hehl, A. B.** (2016). Static clathrin assemblies at the peripheral vacuole - plasma membrane interface of the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *PLOS Pathog.* **12**, e1005756.