

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Josef Pelc

Studium nově objeveného proteinu GL50803_16424 u *Giardia intestinalis*

Investigation of newly discovered protein GL50803_16424 in *Giardia intestinalis*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

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

V Praze, 10. 8. 2018

.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli Pavlovi Doležalovi za odborné konzultace a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat kolegům z laboratoře hlavně Lubošovi Volemanovi, Vladěce Najdrové, Janu Machovi a Míše Marcinčikové a dalším lidem z BIOCEVu, kteří mi pomohli se zpracováním dat Marii Olšinové a Pavlovi Talackovi. Velké díky patří i mé rodině a přítelkyni za podporu, nejen během studií, ale i v životě.

Abstrakt

Anaerobní jednobuněčný eukaryotický organismus *Giardia intestinalis* je celosvětově rozšířený střevní parazit člověka a zvířat. Způsobované onemocnění giardióza je jednou z nejčastějších parazitárních infekcí ve vyspělých částech světa. *G. intestinalis* je také zajímavá svými unikátními buněčnými znaky. Jedním z nich je přítomnost mitosomů, speciálních organel odvozených od mitochondrií. Podobně jako mitochondrie je mitosom ohraničen dvěma membránami a má stejný způsob transportu proteinů. Nicméně mitosom nemá vlastní genom a doposud je známá pouze jedna mitosomální metabolická dráha - syntéza železo-sirných klastrů. Za použití *in vivo* enzymatického značení bylo identifikováno několik nových mitosomálních proteinů včetně GL50803_16424. Naši pozornost upoutal protein GL50803_16424 tím, že interagoval s proteiny všech mitosomálních subkompartmentů: vnější membránou, vnitřní membránou a matrix. Navíc exprese proteinu GL50803_16424 značeného HA tagem vedla k tvorbě neobvyklých struktur v blízkosti mitosomů, které nebyly dříve pozorovány. Bioinformatické přístupy ukázaly, že GL50803_16424 má doménu podobnou „myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein”. Naše data z hmotnostní spektrometrie ukazují, že protein GL50803_16424 interaguje s proteiny endoplazmatického retikula a mitosomu. Úzké spojení mezi proteinem GL50803_16424 a mitosomy bylo pozorováno superrezoluční mikroskopií. V této práci byly určeny některé vlastnosti proteinu GL50803_16424, ale jeho funkce zůstává neznámá.

Klíčová slova: *Giardia intestinalis*, mitosom, GL50803_16424, biotinylace, Mlf1IP

Abstract

The anaerobic unicellular eukaryotic organism *Giardia intestinalis* is a worldwide parasite. Giardiasis, the intestinal disease caused by *Giardia*, is one of the most common parasitic disease in the developed part of the world, that causes health problems not only to humans but also to animals. This organism is also interesting for its many unique cellular features. One of them is the presence of mitosomes - the organelles derived from mitochondria. Analogously to mitochondria, mitosome is limited by two membranes and shares the mode of the protein transport. However, mitosome does not have its own genome and as far as we know, there is only one pathway of the iron-sulfur cluster biosynthesis in this organelle. Using the *in vivo* enzymatic tagging technique, several novel mitosomal proteins were identified, including GL50803_16424. The protein GL50803_16424 attracted our attention by interacting with components of all mitosomal subcompartments: the outer membrane, the membrane and the matrix. In addition, the expression of HA-tagged GL50803_16424 resulted in the formation of peculiar structures near the mitosomes never seen before in *G. intestinalis*. Bioinformatic approaches revealed that the GL50803_16424 has domain similar to the myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein. Our data from mass spectrometry showed that the protein GL50803_16424 interacts with proteins of endoplasmic reticulum and mitosome. The tight connection between the protein GL50803_16424 and mitosomes was detected by super-resolution microscopy. In this work some characteristics of the protein GL50803_16424 were identified, but its function still remains unknown.

Key words: *Giardia intestinalis*, mitosom, GL50803_16424, biotinylation, Mif1IP

Seznam použitých zkratek

ATP adenosintrifosfát

CIA cytosolická dráha skládání železo-sirných klastrů

ECV „encystation carbohydrate-positive vesicles“

ESV „encystation specific vesicles“

GFP zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“)

IPTG izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

ISC železo-sirné klastry („iron-sulfur clusters“)

HA hemaglutinin

HSP „high speed pelet“

PCR polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)

PDI protein disulfid izomeráza

SDS sodiumdodecylsulfát

TIM translokáza vnitřní mitochondriální (mitosomální) membrány

TLCK N-tosyl-L-lysin chlormetyl keton

TOM translokáza vnější mitochondriální (mitosomální) membrány

UTR nepřekládaná oblast („untranslated region“)

VSP „variant-specific surface protein“

Obsah

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1	<i>GIARDIA INTESTINALIS</i>	3
2.1.1	<i>Životní cyklus</i>	3
2.1.2	<i>Buněčná stavba G. intestinalis</i>	5
2.1.2.1	Trofozoit	5
2.1.2.2	Cysta	6
2.2	MITOSOM	7
2.2.1	<i>Vlastnosti mitosomu</i>	8
2.2.2	<i>Biologická funkce mitosomu</i>	9
2.2.3	<i>Transport proteinů do mitosomu</i>	9
2.2.4	<i>Mitosomální proteiny</i>	10
2.3	PROTEIN GL50803_16424	13
2.4	STUDIUM PROTEINŮ U <i>G. INTESTINALIS</i>	15
3	CÍLE PRÁCE	17
4	METODICKÁ ČÁST	18
4.1	MATERIÁLY	18
4.1.1	<i>Roztoky a média</i>	18
4.1.2	<i>Buněčné kultury</i>	21
4.1.2.1	<i>Giardia intestinalis</i>	21
4.1.2.2	<i>Escherichia coli</i>	21
4.1.3	<i>Plazmidy</i>	22
4.1.3.1	pONDRA	22
4.1.3.2	pTG-IscU-DHFR-C-HAHA	23
4.1.3.3	pET-42b	24
4.2	METODY	25
4.2.1	<i>Použité bioinformatické nástroje</i>	25
4.2.2	<i>SDS-PAGE</i>	25
4.2.3	<i>Western blot</i>	25
4.2.4	<i>Amplifikace a klonování genů</i>	27
4.2.4.1	<i>Amplifikace genů</i>	27
4.2.4.2	<i>Klonování genů</i>	28
4.2.5	<i>Transformace bakterií E.coli</i>	29

4.2.6	<i>Transfekce buněk G. intestinalis</i>	30
4.2.7	<i>Frakcionace trofozoitů G. intestinalis</i>	30
4.2.8	<i>Crosslinkování proteinů</i>	31
4.2.9	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	32
4.2.10	<i>Fixace buněk metanolem/acetone</i>	32
4.2.11	<i>Imunofluorescenční značení metanolem/acetone fixovaných preparátů</i>	32
4.2.12	<i>Fixace buněk paraformaldehydem</i>	33
4.2.13	<i>Imunofluorescenční značení paraformaldehydem fixovaných preparátů</i>	34
4.2.14	<i>Příprava preparátu pro superrezoluční mikroskopii STED</i>	34
4.2.15	<i>Expres rekombinantního proteinu</i>	34
4.2.16	<i>Izolace a purifikace rekombinantního proteinu</i>	35
4.2.17	<i>Zkouška proteázou trypsinem</i>	36
4.2.18	<i>Extrakce uhličitanem sodným</i>	36
4.2.19	<i>Modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE)</i>	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	CHARAKTERIZACE PROTEINU GL50803_16424 <i>IN SILICO</i>	38
5.2	VYTVOŘENÍ TRANSFEKOVANÉ LINIE <i>G. INTESTINALIS</i> S GL50803_16424-BAP	40
5.3	LOKALIZACE PROTEINU GL50803_16424 VE WB BUŇKÁCH <i>G. INTESTINALIS</i>	41
5.3.1	<i>Expres rekombinantního proteinu v buňkách E.coli</i>	41
5.3.2	<i>Testování protilátek anti-GL50803_16424</i>	42
5.3.3	<i>Určení lokalizace proteinu GL50803_16424 konfokální mikroskopii</i>	44
5.3.4	<i>Určení lokalizace proteinu GL50803_16424 mikroskopii STED</i>	44
5.3.5	<i>Určení lokalizace 1. a 2. poloviny proteinu GL50803_16424</i>	47
5.4	ZKOUŠKA PROTEÁZOU TRYP SINEM.....	48
5.5	ZKOUŠKA UHLIČITANEM SODNÝM.....	49
5.6	URČENÍ POTENCIÁLNÍCH INTERAKČNÍCH PARTNERŮ GL50803_16424	50
5.6.1	<i>Experiment crosslinkování proteinu GL50803_16424</i>	50
5.6.2	<i>Analýza hmotnostní spektrometrií a výsledná data</i>	51
5.7	MODRÁ NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA GL50803_16424	59
6	DISKUZE	61
6.1	PROTEIN GL50803_16424	61
6.2	LOKALIZACE GL50803_16424	63
6.3	VLASTNOSTI PROTEINU GL50803_16424	64
6.4	CROSSLINK PROTEINU GL50803_16424 A JEHO ANALÝZA	64

6.5	SHRnutí.....	66
7	ZÁVĚR	67
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

1 Úvod

Giardia intestinalis je anaerobní parazitický prvok patřící do řádu Diplomonadida, jednobuněčných eukaryotických organismů z říše Excavata. Prvně byl tento prvok pozorován „otcem“ mikroskopie Anthoniem van Leeuwenhoekem v roce 1681, v té době však nebylo dáno pozorování tohoto prvoka v lidské stolici do souvislosti s jeho patologickým významem. Jako první popsal morfologické znaky tohoto bičíkovce český lékař a biolog Vilém Dušan Lambl a pojmenoval ho *Cercomonas intestinalis*. Pojmenování tohoto druhu se během let měnilo a jedním z názvů je i *Giardia lamblia*, které vzniklo na počest již zmíněného českého vědce a francouzského zoologa A.M. Giarda. Dnes se upřednostňuje označení *Giardia intestinalis* a je známo, že se jedná o jednoho z nejčastějších původců střevních parazitárních nákaz (Adam, 2001). Onemocnění zvané giardióza je celosvětově rozšířená střevní průjemová onemocnění postihující obratlovce, vyskytující se zejména v zemích s nižším hygienickým standardem.

Přestože se *G. intestinalis* řadí mezi eukaryotické organismy, postrádá několik, pro eukaryotické organismy, typických organel (Acosta-Virgen et al., 2018; Luján et al., 1995; Tovar et al., 2003). Z tohoto důvodu je tento prvok zajímavým modelovým organismem pro studium evoluce buněčných drah. *G. intestinalis* tak představuje významného prvoka nejen z hlediska lékařského, ale také z pohledu evolučního. *G. intestinalis* patří spolu s *Entamoeba histolytica* a zástupci kmene mikrosporidií k těm organismům, o kterých se předpokládalo, že jsou amitochondriální, tedy postrádají esenciální organelu - mitochondrii (Roger et al., 2017). Vědecká pozorování však v těchto organismech odhalila přítomnost dvoumembránových buněčných struktur od mitochondrie odvozených, které byly následně pojmenovány mitosomy (Tovar et al., 2003). V současné době mitosomy představují nejjednodušší známou formu mitochondrie. Mezi hlavní odlišnosti mitosomů od mitochondrií patří nepřítomnost vlastního genomu, ztráta respiračního řetězce a neschopnost tvorby ATP (Roger et al., 2017).

Za dosud jedinou zjištěnou biologickou dráhu v mitosomu se považuje tvorba železo-sírných klastrů, které v buňce slouží jako kofaktory mnoha esenciálních proteinů (Tovar et al., 2003). Několik proteinů ISC (iron-sulfur cluster assembly) dráhy bylo již u *G. intestinalis* experimentálně potvrzeno (Rada et al., 2009; Tovar et al., 2003). Studium dalších mitosomálních proteinů je však vzhledem k malé velikosti mitosomů a jejich počtu v buňce velmi obtížné. Jednu z možností,

jak tyto proteiny zkoumat, přinesla nedávno publikovaná metoda *in vivo* enzymatického značení, která umožnila identifikovat zcela nové mitosomální proteiny (Martincová et al., 2015). Jedním z identifikovaných proteinů je i protein s databázovým označením GL50803_16424. Mikroskopická pozorování buněk *G. intestinalis* overexprimující tagovaný protein GL50803_16424 odhalila nezvyklé struktury, nepodobné dosud známým buněčným kompartmentům v *G. intestinalis*. Další experimenty s tímto proteinem naznačily neobvyklou topologii tohoto proteinu a možnou interakci se zástupci všech mitosomálních subkompartmentů. Vzhledem k tomu, jak málo se ví o mitosomálním proteomu a mitosomech obecně, zasluhuje protein GL50803_16424 naši pozornost.

2 Literární přehled

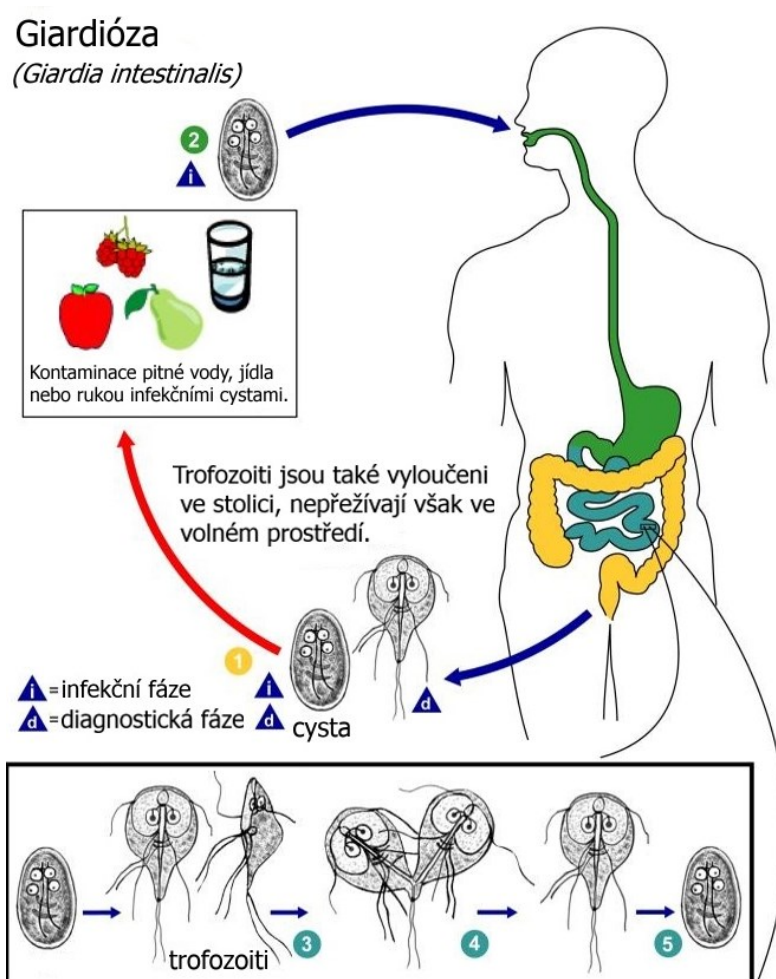
2.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis (další názvy *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*; česky také lamblie střevní) je parazitický prvok patřící do řádu Diplomonadida, jednobuněčných eukaryotických organismů z třídy Treponomadea, kmene Fornicata, říše Excavata. *G. intestinalis* je jednou z nejranějších větví eukaryotického fylogenetického stromu (Ramesh et al., 2005). *G. intestinalis* je jako jediný druh z rodu *Giardia* schopen vyvolat průjmové onemocnění u člověka, mimo jiné však infikuje i domácí zvířata (Adam, 2001). Na základě dat z genetických analýz bylo určeno, že v případě organismu *G. intestinalis* se nejedná o jeden druh, ale o druhový komplex skládající se z osmi (A-H) morfologicky stejných, avšak geneticky odlišných linií, takzvaných asambláží (z angl. slova assemblage) (Cacciò and Ryan, 2008; Lasek-Nesselquist et al., 2010; Monis et al., 2003). Nicméně pouze asambláže A a B jsou schopny infikovat člověka, ostatní asambláže jsou hostitelsky specifické (Cacciò and Ryan, 2008). Osekvenováním genomu se zjistilo, že *G. intestinalis* má redukovaný genom obsahující pouze několik homologů známých mitochondriálních proteinů. Zároveň bylo zjištěno, že mnoho genů je vysoce divergentních a specifických pro tohoto prvoka. Důsledkem toho bylo u *G. intestinalis* objeveno mnoho nových genů a genových rodin (Franzén et al., 2009; Morrison et al., 2007). Osekvenovaný genom asambláže A izolátu WB, který je nejrozšířenější v laboratorní praxi, má velikost 12,83 Mbp a počet genů dosahuje čísla 9747 (Aurrecochea et al., 2009).

2.1.1 Životní cyklus

G. intestinalis se během svého životního cyklu vyskytuje ve dvou morfologicky odlišných formách, které odráží schopnost tohoto prvoka se adaptovat na dvě odlišná prostředí (Obr. 1). Jedná se o stádium nepohyblivé cysty a pohyblivé vegetativní formy nazývané trofozoit. Tyto stádia lze od sebe snadno odlišit podle rozdílné morfologické struktury. Bičíkaté stádium trofozoita obývá lumen tenkého střeva hostitele, zatímco odolná cysta je přizpůsobena na průchod tlustým střevem a na přežití ve vnějším prostředí. Skrze stádium cysty je umožněn i přenos do dalšího hostitele. K infekci hostitele dochází požitím cysty v kontaminované vodě nebo kontaminovanou potravou (Adam, 2001). Při průchodu trávicím traktem hostitele reaguje cysta na nízké pH v žaludku. Následným postupným zvyšováním pH v dalších částech trávicího traktu probíhá proces excystace, který je dokončen v lumen tenkého střeva (Bingham and Meyer, 1979; Bingham et al., 1979).

Po excystaci čtyřjaderné cysty se do lumen tenkého střeva uvolní tzv. excyzoit, který se vzápětí rozdělí na dva dvoujaderné trofozoity (Adam, 2001). Ve dvanáctníku se mohou trofozoiti asexuálně množit podélným binárním dělením a mohou se přichytit na povrch enterocytů pomocí ventrálně umístěného přísavného disku, nebo zde žijí volně. V tomto stavu jsou trofozoiti schopni přežít týdny a v některých případech i několik let (Smith et al., 1982). Část trofozoitů encystuje v reakci na přítomnost žlučových solí a mastných kyselin v tenkém střevě a na více zásadité pH (Gillin et al., 1988). Encystací a opětovným uvolněním cysty do vnějšího prostředí je zakončen životní cyklus (Filice, 1952).



Obr. 1: Životní cyklus prvoka *G. intestinalis*. Převzato a upraveno z <https://www.cdc.gov/dpdx/>.

2.1.2 Buněčná stavba *G. intestinalis*

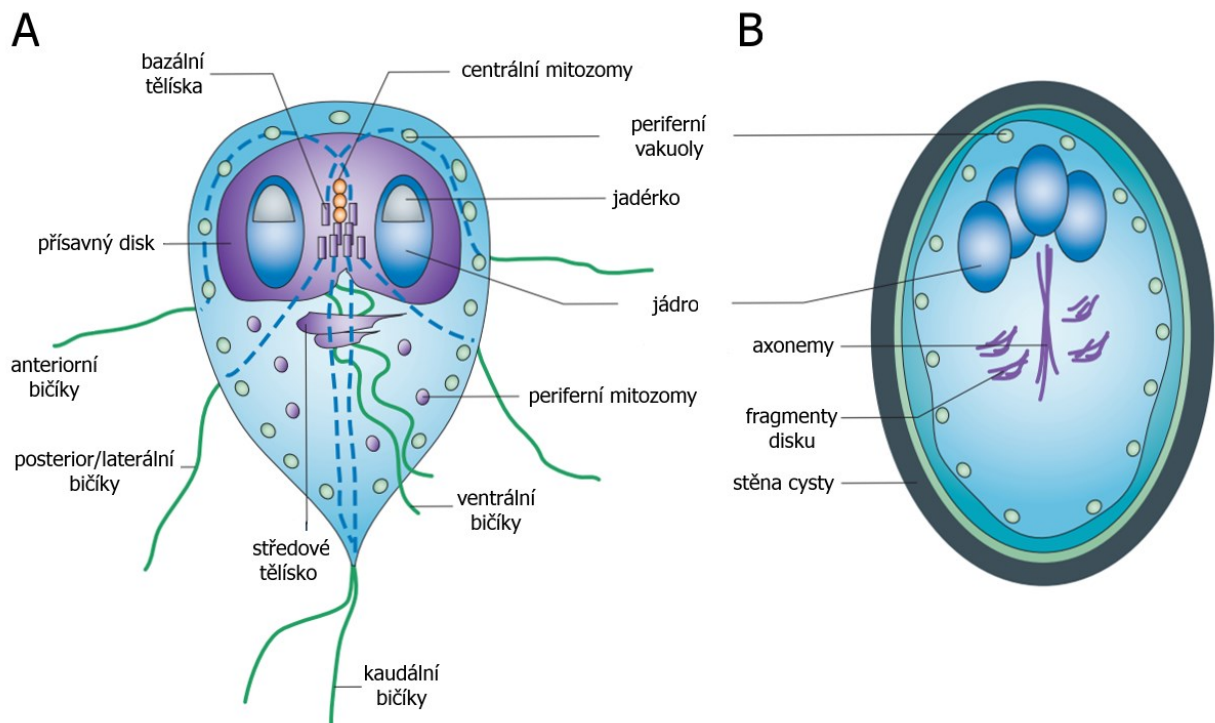
Charakteristickým znakem pro obě stádia *G. intestinalis* je nepřítomnost typických eukaryotických organel mitochondrií a peroxizomů (Gillin et al., 1996). Později však byla objevena přítomnost od mitochondrie odvozených dvoumembránových organel označovaných jako mitosomy (Tovar et al., 2003). Předpokládá se, že i stanovisko ohledně nepřítomnosti peroxizomů bude brzy přehodnoceno, neboť nejnovější práce Acosta-Virgena a kol. poukazuje na přítomnost peroxizomálních proteinů v cytoplazmě trofozoitů *G. intestinalis* (Acosta-Virgen et al., 2018).

2.1.2.1 Trofozoit

Trofoziti mají kapkovitý tvar (s jednou stranou plochou a druhou zaoblenou) a rozměr 12-15 μm na délku a 5-9 μm na šířku (Obr. 2). Cytoskelet trofozoita zahrnuje středové tělísko, celkem 8 bičíků (rozdělné na páry – anteriorní, posterior/laterální, ventrální a kaudální) a ventrálně umístěný přísavný disk (Adam, 2001). Unikátní cytoskeletární struktura označována jako „median body“ je soubor kontraktilních proteinů vyskytujících se ve středu buňky. Pravděpodobně slouží jako zásobárna polymerizovaného tubulinu pro tvorbu adhezivního disku (Piva and Benchimol, 2004). Dalším typickým znakem trofozoitů je přítomnost dvou symetricky umístěných jader, o kterých se myslelo, že postrádají jadérka, nicméně jejich přítomnost byla nedávno experimentálně prokázána (Jiménez-García et al., 2008). Dále jsou v cytoplazmě trofozoita rozptýlené periferní vakuoly, ribozomy a glykogenová granula, která slouží jako zásobárna energie (Ladeira et al., 2005; Sogayar et al., 1991). Endomembránový systém *G. intestinalis* je rovněž velmi odvozený. Chybí, pro ostatní eukaryota typické, organely endozom (časný i pozdní) a lyzozom. Jejich funkci přebraly již zmiňované unikátní membránové struktury označované jako periferní vakuoly. Ty jsou umístěné pod plazmatickou membránou na okraji trofozoita, kromě oblasti adhezivního disku (Feely and Dyer, 1987; Friend, 1966; Lanfredi-Rangel et al., 1998). Periferní vakuoly jsou skrze tubulovezikulární síť v kontaktu s rozptýlenou sítí endoplazmatického retikula (Abodeely et al., 2009; Sogin et al., 1989). V trofozoitech nebyla morfologicky ani biochemicky potvrzená přítomnost Golgiho komplexu. Struktury, odpovídající Golgiho komplexu, označované jako encystačně specifické vezikuly byly však pozorovány u encystujících buněk (Gillin et al., 1987; Luján et al., 1995; Reiner et al., 1990).

2.1.2.2 Cysta

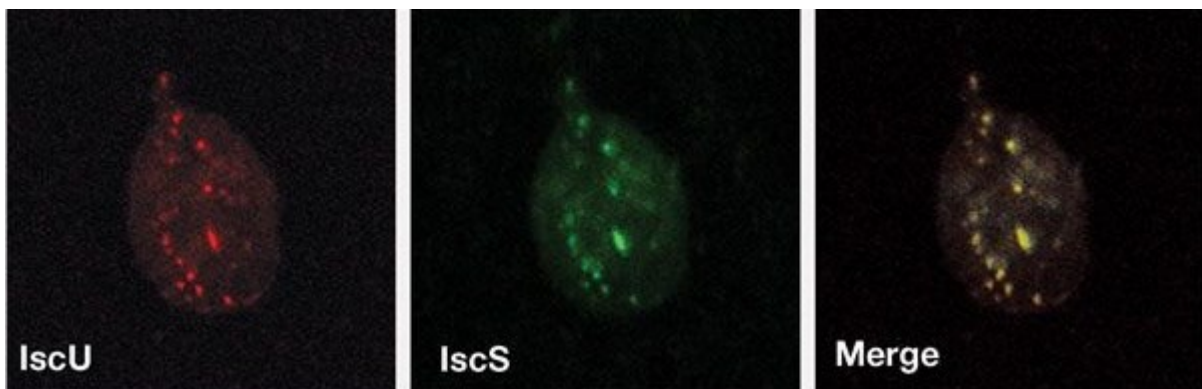
Proces encystace je zahájen v reakci na okolní podmínky. V jeho průběhu dojde k replikaci jader a výsledkem procesu je vznik čtyřjaderné cysty (Obr. 2) (Adam, 2001). Cysta má oválný tvar o rozměrech 8-12 μm na délku a 7-10 μm na šířku a její povrch tvoří stěna cysty o tloušťce 0,3-0,5 μm , která je tvořena čtyřmi glykoproteiny o velikostech 29, 75, 88 a 102 kDa (Erlandsen et al., 1990). Během encystace dojde k zakulacení buňky trofozoita, endocytózou řízené internalizaci bičků a k utvoření stěny cysty (Midlejš and Benchimol, 2009). Během této přeměny trofozoita na cystu dochází ke ztrátě schopnosti prvoka adherovat k povrchu a dochází k postupné fragmentaci přísavného disku. Zároveň se začínají objevovat dva typy membránových vezikulů: encystačně specifické vezikuly, označované též jako ESV (z anglického spojení encystation specific vesicles) a encystační vezikuly pozitivní na karbohydráty, zkráceně ECV (z anglického spojení encystation cyrbohydrate-positive vesicles) (Midlejš et al., 2017). Vezikly ESV se považují za stádiově-specifickou obdobu Golgiho komplexu (Marti and Hehl, 2003; Marti et al., 2003). Oba typy váčků se účastní výstavby stěny cysty, která následně zajišťuje pevnou strukturu a vysokou odolnost cysty (Midlejš et al., 2013).



Obr. 2: Schéma buněk dvou stádií *G. intestinalis* – trofozoita (A) a cysty (B). Převzato a upraveno od (Ankarklev et al., 2010).

2.2 Mitosom

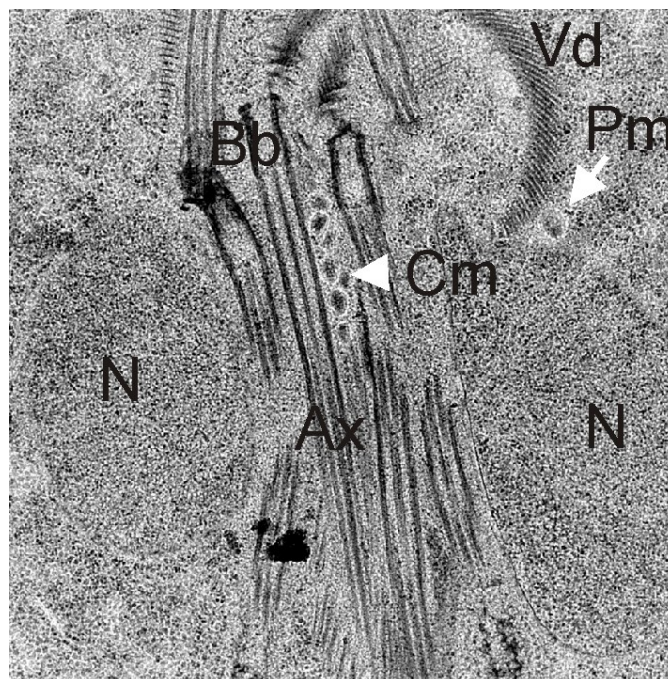
Po dlouho dobu byl prvok *G. intestinalis* považován za primitivní organismus postrádající pro eukaryotické organismy typickou organelu - mitochondrii, avšak objevení od mitochondrie odvozených organel u dalších organismů žijících v prostředích s nízkou koncentrací kyslíku, o kterých se uvažovalo jako o amitochondriálních (*Entamoeba histolytica*), vedlo ke snaze prokázat přítomnost těchto organel i u *G. intestinalis* (Tovar et al., 1999; Tovar et al., 2003). Tovar a kol. experimentálně prokázali, využitím dvou proteinů dráhy pro biosyntézu železo-sirných klastrů (IscU a IscS) jako mitochondriálních markerů, přítomnost dvoumembránových struktur, označovaných jako mitosomy i u tohoto prvoka (Obr. 3) (Tovar et al., 2003). Dalším důkazem potvrzujícím odvození mitosomu od mitochondrie bylo zjištění způsobu směřování, transportu a procesování mitosomální proteinů (viz kapitola 2.2.3) (Dolezal et al., 2005). Mitosomy představují nejjednodušší formu od mitochondrie odvozených organel a kromě *Entamoeba histolytica* a *G. intestinalis* byl jejich objev potvrzen i u některých druhů mikrosporidií, konkrétně *Encephalitozoon cuniculi*, *Trachipleistophora hominis*, *Cryptosporidium parvum* a u vnitrobuněčného parazita *Mikrocytos mackini* (Burki et al., 2013; Katinka et al., 2001; LaGier et al., 2003; Williams et al., 2002).



Obr. 3: Buňky trofozoitů obarvené specifickými protilátkami proti proteinům IscU a IscS. Proteiny kolokalizují v mitosomech. Převzato od (Tovar et al., 2003).

2.2.1 Vlastnosti mitosomu

Mitosomy u *G. intestinalis* jsou organely oválného tvaru a jejich velikost je v průměru 100 nm, jejich počet v buňce je velmi nízký a obvykle se pohybuje mezi 40-50 (Regoes et al., 2005). Na rozdíl od mitochondrie postrádají mitosomy vlastní genom (Léon-Avila and Tovar, 2004). Další rozdíl mezi mitochondrií a mitosomem je v dynamice organely. Voleman a kol. zjistili, že dělení mitosomů je synchronní s mitózou buňky. Zároveň nebyla pozorována fúze mitosomů (Voleman et al., 2017). Stejná práce poukázala na asociaci endoplazmatického retikula a mitosomů nejen během dělení mitosomů, ale po celý životní cyklus, nicméně nebyl identifikován proteinový komplex umožňující spojení mezi těmito organelami. Mitosomy se u *G. intestinalis* rozlišují na dva typy podle jejich tvaru a lokalizace v buňce (Obr. 4). Prvním typem jsou mitosomy centrální, které mají protáhlejší tvar a shlukují se v místě mezi jádry v blízkosti bazálních tělísek a axonem (Hehl et al., 2007). Ostatní mitosomy v buňce se označují jako periferní mitosomy a jsou rozprostřeny v cytoplazmě.



Obr. 4: Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující pozici na sebe natěsnaných centrálních mitosomů (Cm). Na snímku lze spatřit i osamocený periferní mitosom (Pm) a další struktury buňky trofozoita (jádra – N, bazální tělíska – Bb, axonemy – Ax a ventrální disk – Vd). Převzato od (Hehl et al., 2007).

2.2.2 Biologická funkce mitosomu

Jednou ze základních biologických funkcí mitochondrie v eukaryotické buňce je produkce makroergní molekuly ATP. Další organela odvozená od mitochondrie tzv. hydrogenozom, přítomný u mnoha linií anaerobních protist se podílí na tvorbě ATP na úrovni substrátové fosforylace tím, že produkuje vodík jako vedlejší produkt. Mitosomy však makroergní molekulu ATP neprodukují ani jinak nepřispívají k její produkci (Lindmark and Müller, 1973; Van Der Giezen, 2009).

Zcela esenciální biologickou dráhou mitochondrie je maturace železo-sirných klastrů v matrix mitochondrie. Tato dráha označovaná jako ISC (z anglického spojení iron-sulfur clusters) zajišťuje tvorbu železo-sirných klastrů, jak pro správné složení a funkci proteinů mitosomálních (akontitáza, podjednotky respiračních komplexů I, II a III), tak proteinů cytosolických, které tvoří holoproteiny s železo-sirnými klastry v rámci CIA (cytosolic iron-sulfur cluster assembly) dráhy. Dráha ISC se skládá z proteinů zajišťujících tvorbu železo-sirného klastru na tzv. „scaffold“ proteinu a z proteinů, které zajistí přenos železo-sirného klastru na příslušné apoproteiny (Lill, 2009; Lill and Kispal, 2000). U kvasinkového modelu *Saccharomyces cerevisiae* je tato dráha tvořena řadou proteinů, z nichž některé byly identifikovány i v mitosomu *G. intestinalis* (Tovar et al., 2003).

U *G. intestinalis* nebyly nalezeny homology enzymů, které by potvrdily přítomnost Krebsova cyklu, nebyly objeveny ani geny spojené se syntézou nukleotidů a aminokyselin nebo enzymy potřebné pro *de novo* syntézu lipidů (Brown et al., 1998; Morrison et al., 2007).

2.2.3 Transport proteinů do mitosomu

Jaderně kódované mitochondriální proteiny translatované v cytosolu jsou posttranslačně transportovány do mitochondriálních kompartmentů a obsahují signální sekvenci vyskytující se nejčastěji na N-konci prekurzoru daného proteinu, někdy však může být signální sekvence integrální. Signální sekvence je rozeznána receptorovými proteiny komplexů TOM (translokáza vnější membrány) a TIM (translokáza vnitřní membrány). Různé proteiny těchto komplexů pak zajišťují i samotný import proteinů do příslušného kompartmentu mitochondrie (Neupert, 1997; Rehling et al., 2001). Po translokaci dochází k odštěpení N-koncové signální sekvence metalopeptidázou MPP (z angl. mitochondrial processing peptidase) (Gakh et al., 2002). Doležal a kol. zjistili přítomnost signálních sekvencí u homologů proteinů ISC dráhy u *G. intestinalis*, a to

jak N-koncových („scaffold“ protein *GiiscU* a ferredoxin *Gifdx*), tak integrálních (*GiiscS*). Výsledky z této studie tak potvrdily podobnost mitosomálního a mitochondriálního transportního systému. Toto tvrzení podpořilo i objevení proteinu homologního k jedné z podjednotek MPP (Dolezal et al., 2005; Šmíd et al., 2008).

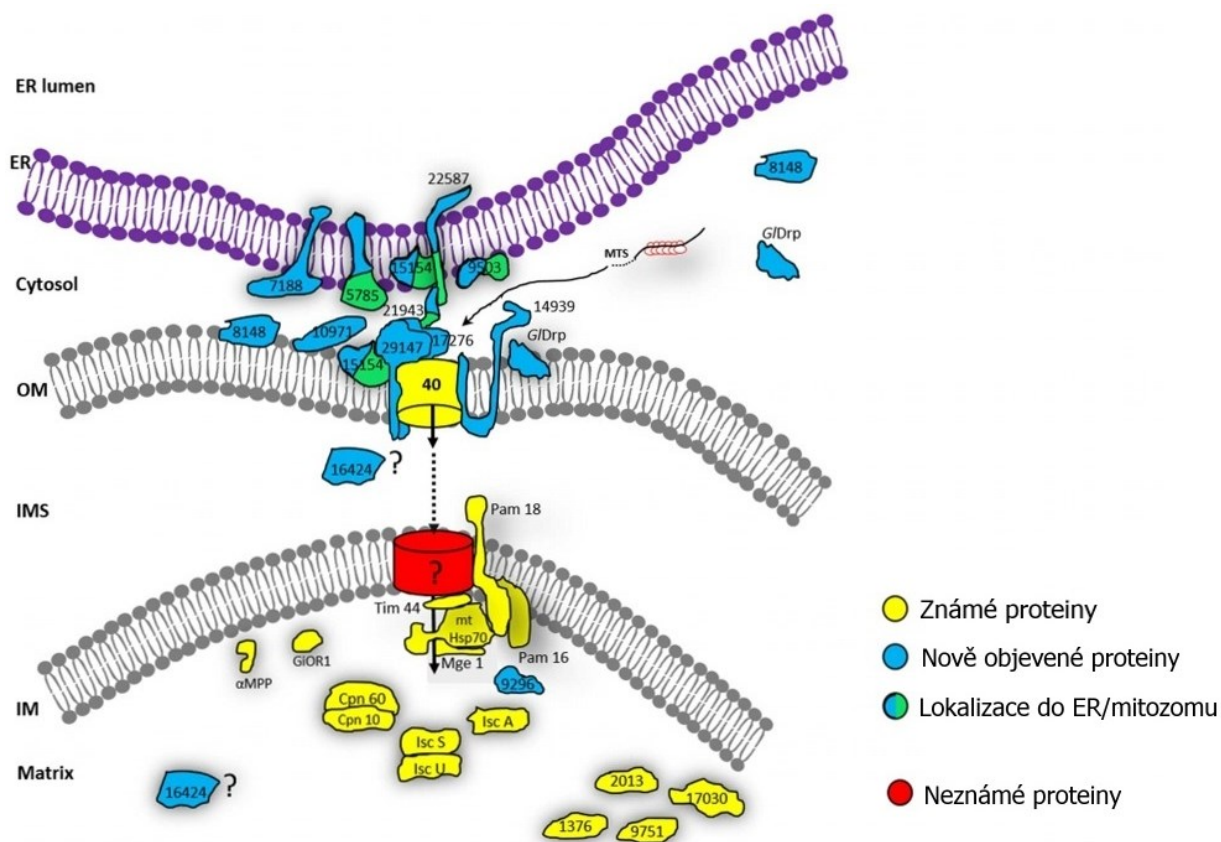
2.2.4 Mitosomální proteiny

Vzhledem k malému množství mitosomů v buňkách *G. intestinalis* a zároveň velkému zastoupení ostatních buněčných struktur (převážně endoplazmatického retikula) je studium mitosomálních proteinů pomocí centrifugačních nebo jiných klasických separačních technik obtížnou záležitostí. Nový přístup, který by snížil kontaminaci mitosomální frakce zvolili Jedelsky a kol., kteří využili izobaricky značených proteinů ve frakci obohacené na mitosomy a následně pomocí kvantitativní a bioinformatické analýzy identifikovali více než sto potenciálních mitosomálních proteinů. Díky tomuto přístupu byla u dvaceti proteinů experimentálně potvrzena mitosomální lokalizace (Tabulka 1) (Jedelsky et al., 2011).

Pomocí metody založené na *in vivo* enzymatickém značení proteinů byly později identifikovány divergentní protein mitosomálního TIM komplexu *GiTim44* a protein vnější mitosomální membrány *GiMomp35*, který se také účastní mitosomálního importu proteinů (Martincová et al., 2015). Martincová a kol. využili specifické enzymatické aktivity biotin ligázy (BirA) z organismu *E. coli*, která za spotřeby ATP je schopna připojit molekulu biotinu k tzv. biotin akceptorovému peptidu (BAP) (Howarth and Ting, 2008). V jejich experimentu byly připraveny konstrukty již známých mitosomálních proteinů (*GiPam18*, *GiTom40*, *GimtHsp70* a nově objevených *GiTim44* a *GiMomp35*) s připojeným biotin akceptorovým peptidem na svém C-konci, které byly následně biotinylovány *in vivo* v buňkách *G. intestinalis*, které stabilně exprimovaly biotin ligázu (BirA). V další fázi tohoto experimentu autoři crosslinkovali buněčnou frakci HSP (z angl. high speed pelet) obohacenou o mitosomy a díky známé interakci biotinu a streptavidinu byli schopni provést vytažení biotinylovaných proteinů i s jejich potenciálními interakčními partnery. Následnou analýzou na hmotnostním spektrometru bylo vybráno několik proteinů, kterým byla posléze experimentálně určena mitosomální lokalizace (Tabulka 1) (Martincová et al., 2015).

Dalším přístupem založeným na ko-imunoprecipitačních pokusech vycházejících z proteinu *GiTom40* bylo odhaleno několik dalších možných mitosomálních proteinů (Rout et al., 2016). Rout a kol. koimunoprecipitovali protein vnější mitosomální membrány (*GiTom40*) a následnou

analýzou hmotnostní spektrometrií získali několik jeho potenciálních interakčních partnerů. Procesem zpětné ko-imunoprecipitace bylo objeveno několik dalších proteinů lokalizovaných v mitosomu. Tato práce navíc ověřila správnost určení lokalizace v mitosomu proteinů objevených dříve Martincovou a kol. Mimo jiné byla v práci Routa a kol. pozorována duální lokalizace některých proteinů v endoplazmatickém retikulu/mitosomu. Na základě těchto zjištění bylo navrženo schéma interakcí mitosomálních proteinů a jejich lokalizace v mitosomu (Obr. 5) (Rout et al., 2016).



Obr. 5: Schématický model mitosomálního interaktomu v *G. intestinalis* vytvořený na základě ko-imuniprecipitačních experimentů s *GiTom40* (Rout et al., 2016). Známé proteiny jsou označeny žlutě; nově objevené proteiny jsou označeny modře. Proteiny s duální lokalizací jsou označeny zeleno-modře. Předpokládaná translokáza vnitřní membrány, avšak dosud neobjevená, je vyznačena červeně. Převzato od Rout et al., 2016.

ID proteinu	označení proteinu	popis proteinu	zdroj
GL50803_103891	Cpn60	chaperonin 60	Regoes et al., 2005
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	Regoes et al., 2005
GL50803_14821	IscA-2	„scaffold“ protein	Jedelský et al., 2011
GL50803_14519	IscS	cysteindesulfuráza	Tovar et al., 2003
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	Šmíd et al., 2008
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 mitochondriální membrány	Dagley et al., 2009
GL50803_14845	Tim44	translokáza vnitřní mitochondriální membrány	Martincová et al., 2015
GL50803_15985	VMP	VAMP asociovaný protein	Jedelský et al., 2011
GL50803_14939	Mom35	protein vnější mitochondriální 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_29147		protein s neznámou funkcí	Rout et al., 2016
GL50803_15154		protein s neznámou funkcí	Rout et al., 2016
GL50803_5785		protein s neznámou funkcí	Rout et al., 2016
GL50803_9503		protein s neznámou funkcí	Rout et al., 2016

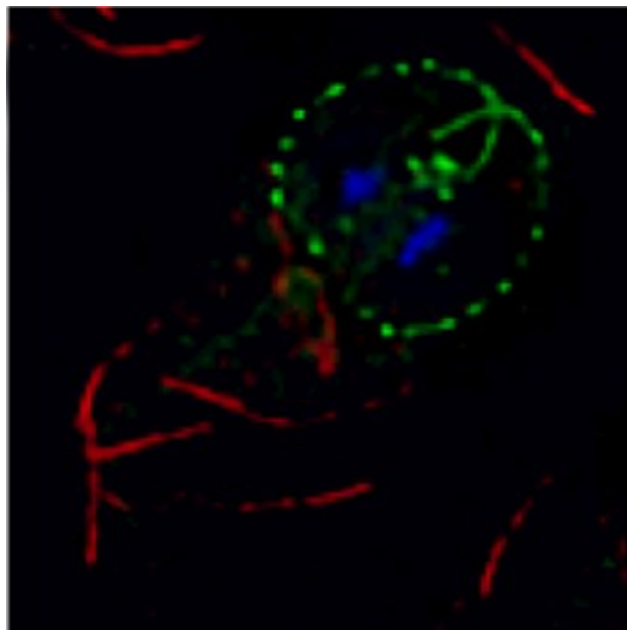
GL50803_21943		protein s neznámou funkcí	Rout et al., 2016
GL50803_9296		protein s neznámou funkcí	Jedelský et al., 2011
GL50803_14939		protein s neznámou funkcí	Jedelský et al., 2011
GL50803_15985		protein s neznámou funkcí	Jedelský et al., 2011
GL50803_27910		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_22587		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_16386		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_12229		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_17276		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_10971		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_4852		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_8148		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_7035		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_7188		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_3491		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_8358		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015
GL50803_16424		protein s neznámou funkcí	Martincová et al., 2015

Tabulka 1: Přehled dosud známých proteinů, jejichž lokalizace v mitosomu *G. intestinalis* byla experimentálně ověřena. Jsou identifikovány proteiny podílející se na tvorbě železo-sírných klastrů (modře označené), proteiny podílející se na transportu proteinů do mitosomů (růžově označené). Dále byla přítomnost v mitosomu určena pro proteiny s dosud neznámou funkcí (zeleně označené). Lokalizace proteinu GL50803_16424 v mitosomu je předmětem této práce (žlutě označený). Částečně převzato z Jedelský et al., 2011.

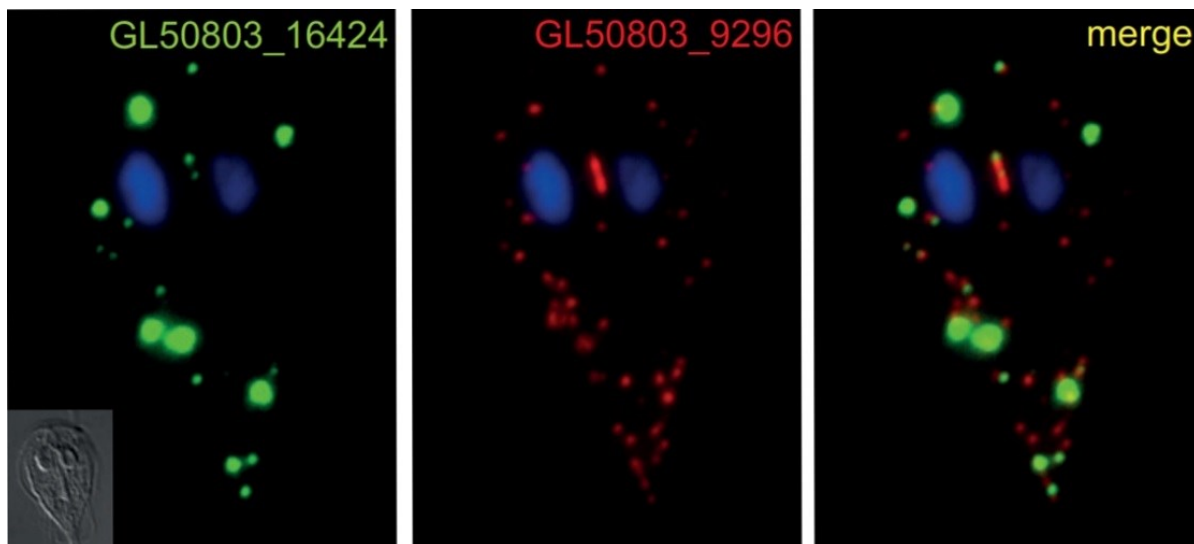
2.3 Protein GL50803_16424

Objevení proteinu GL50803_16424 bylo prvně zaznamenáno v roce 2011, kdy Jedelský a kol. pomocí svého přístupu určili na základě bioinformatických nástrojů GL50803_16424 jako potenciální mitosomální protein (Jedelský et al., 2011). Avšak ve stejném roce byl protein GL50803_16424 popsán jako jeden z nových proteinů asociovaných s ventrálním přísavným diskem (DAP - z angl. disc-associated protein) lokalizující v blízkosti bazálních tělísek a laterálního hřbetu, speciální struktury ventrálního disku *G. intestinalis* (Obr. 6) (Hagen et al., 2011). Nicméně pochyby o této lokalizaci proteinu GL50803_16424 přineslo zjištění Martincové a kol., že tento protein koprecipitoval v jejich práci (viz kapitola 2.2.4) se zkoumanými proteiny ze všech mitosomálních kompartmentů. Při experimentálním ověření lokalizace

GL50803_16424 byla v práci Martincové a kol. pozorována převážná lokalizace tohoto proteinu do mitosomů, dále však byla pozorována přítomnost neobvyklých sférických struktur (Obr. 7), které žádný z dalších zkoumaných proteinů v této studii nevykazoval (Martincová et al., 2015). Další určení proteinu GL50803_16424 jako proteinu mitosomálního přinesla práce Routa a kol., nicméně další vlastnosti a role tohoto proteinu v rámci mitosomu, respektive organismu *G. intestinalis*, zůstávají stále neznámé (Rout et al., 2016).



Obr. 6: Lokalizace proteinu GL50803_16424 do oblasti ventrálního disku v buňce trofozoita *G. intestinalis*. Protein GL50803_16424 byl vizualizován za využití C-koncově připojené GFP (zelený fluorescenční protein) značky (zeleně označený); mikrotubulární cytoskelet je značen protilátkou proti alfa tubulinu (červeně) a jádra barvená DAPI (modře). Převzato z Hagen et al., 2011.



Obr. 7: Lokalizace potenciálního mitosomálního proteinu GL50803_16424 exprimovaného v buňkách *G. intestinalis* s připojeným HA (hemaglutininovým) tagem. Barveno pomocí anti-HA (zeleně) značící protein GL50803_16424, anti- GL50803_9296 slouží jako marker mitosomů (červeně) a jádra barvena DAPI (modře). Jsou viditelné zvláštní sférické struktury. Převzato od Martincová et al., 2015.

2.4 Studium proteinů u *G. intestinalis*

U *G. intestinalis* není k dispozici mnoho biologických nástrojů pro studium proteinů, a to jak pro genetickou manipulaci, tak pro zobrazování živých buněk. Využití fúzních proteinů s GFP nebo jeho deriváty je u *G. intestinalis* omezené. Tato metoda, která je pro zobrazování struktur v buňkách hojně využívána, vyžaduje pro správné složení fluoroforu přítomnost molekulárního kyslíku (Chudakov et al., 2010; Martincová et al., 2012). Pro anaerobní organismy, jakým je *G. intestinalis*, je však kyslík toxický a tuto metodu lze aplikovat pouze na pozorování velkých buněčných struktur (Martincová et al., 2012). Pro specifické značení organel a jejich pozorování v živých buňkách *G. intestinalis* byla úspěšně použita nová technika označovaná HaloTag, využívající mutovanou formu holoalkan dehalogenázy jako reportérového proteinu (Martincová et al., 2012).

Kvůli polyploidii trofozoita *G. intestinalis* (vlastní dvě transkripčně aktivní diploidní jádra) a nepřítomnosti dráhy nehomologického spojování konců (NHEJ "non-homologous end joining") jsou genetické manipulace vyřazení nebo utlumení genu téměř nemožné (Bernander et al., 2001; Morrison et al., 2007). Vytvoření transgenních buněk pomocí transfekce cirkulárních plazmidů obsahujících cílený gen a selekční marker je tak v současné době nejefektivnější metoda pro studium molekulární biologie *G. intestinalis*. Nevýhodou tohoto systému je však malé

množství vhodných selekčních markerů, respektive antibiotik. V nedávné době Wampfler a kol. provedli první „knockout“ genu v *G. intestinalis* pro protein, který je hlavní komponentou pro stavbu stěny cysty. Použili velmi pracnou metodu, využívající Cre/loxP systém, umožňující recyklovat selekční markery (Wampfler et al., 2014). Rozšířenou metodou pro „knockdown“ proteinu v *G. intestinalis* je používání modifikovaných „antisense“ oligonukleotidů nazývaných morfolino, které namísto ribózového nebo deoxyribózového kruhu obsahují tzv. morfolinový kruh. Párování s molekulami DNA a RNA zjišťuje přítomnost shodných bazí (A, T, C, G). Sekvenčně specifická vazba morfolina na mRNA pak znemožňuje nasednutí dalších proteinových faktorů. Pokud jsou morfolina navržena tak, aby se vážala do oblasti místa startu translace cílového genu, dochází k blokaci nasednutí ribozomu a zabránění translaci (Carpenter and Cande, 2009; Summerton, 1999). Použití morfolin blokujících translaci proteinu lze dočasně snížit hladinu cílového proteinu až o 60 %, nicméně se jedná o metodu finančně náročnou (Carpenter and Cande, 2009). Návrh na optimalizovanou metodu pro „knockdown“ cílových gen přinesla velice nedávná práce McNally a kol. využívající CRISPR interference (CRISPRi) (McNally et al., 2018). Jedná se o modifikovaný systém CRISPR/Cas9, kdy je možné pomocí katalyticky inaktivní Cas9 (označovaná dCas9) provést místně-specifickou transkripční represi a tím zajistit rychlou a stabilní manipulaci genové exprese v *G. intestinalis* (McNally et al., 2018).

3 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo charakterizovat nově identifikovaný protein GL50803_16424 v organismu *G. intestinalis*. Tento protein byl prvně identifikován jako protein asociovaný s diskem, později však byla určena jeho mitosomální lokalizace (Hagen et al., 2011; Martincová et al., 2015). Při overexpressi tohoto proteinu v buňkách *G. intestinalis* byly pozorovány sférické struktury v blízkosti mitosomů, které nebyly nikdy dříve u tohoto organismu objeveny (Martincová et al., 2015). Tato práce si klade za cíl přispět k současným znalostem o proteinu GL50803_16424 následujícími cíli: určit jeho lokalizaci, interakční partnery, případně funkci v organismu *G. intestinalis*.

Praktické cíle:

1. Charakterizace proteinu GL50803_16424 pomocí bioinformatických nástrojů.
2. Připravit vhodnou buněčnou linii s konstruktem pro další manipulaci s proteinem GL50803_16424.
3. Vytvořit specifickou protilátku proti proteinu GL50803_16424.
4. Lokalizovat protein GL50803_16424 ve WB buňkách *G. intestinalis*.
5. Identifikovat interakční partnery GL50803_16424 pomocí crosslinkování tohoto proteinu a následnou analýzou komplexu na hmotnostním spektrometru.
6. Určit vlastnosti proteinu GL50803_16424 pomocí zkoušky trypsinem a zkouškou uhličitanelem sodným.
7. Charakterizovat protein GL50803_16424 pomocí BN-PAGE (modrá nativní elektroforéza)

4 Metodická část

4.1 Materiály

4.1.1 Roztoky a média

LB médium

- 1% trypton
- 0,5% kvasnicový extrakt
- 1% NaCl (Sigma)

SOC médium

- 2% trypton
- 0,5% kvasnicový extrakt
- 10mM NaCl (Sigma)
- 2,5mM KCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM MgSO₄
- 20mM glukóza (přidána po autoklávování)

TEA (50x koncentrovaný)

- 40mM Tris (Sigma)
- 2mM EDTA (Sigma)
- 20mM kyselina octová
- pH 8,5

Coomasie brilliant blue barvicí roztok

- 0,5% Coomasi brilliant blue (ThermoFisher)
- 40% metanol (Lach-ner)
- 10% kyselina octová

Odbarvovací roztok

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

Blotovací pufr

- 25mM Tris (Sigma)
- 192mM glycin
- 10% metanol (Lach-ner)

SM

- 250mM sacharóza
- 20mM MOPS
- pH 7,4

ST

- 250mM sacharóza
- 10mM Tris (Sigma)
- 0,5mM KCl
- pH 7,2

Blokovací roztok – preparáty

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

PBS

- 137mM NaCl (Sigma)
- 2,7mM KCl
- 10mM Na₂HPO₄
- 1,8mM KH₂PO₄

„Incubation“ pufr

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

„Boiling“ pufr

- 50mM Tris (Sigma)
- 1mM EDTA (Sigma)
- 1% SDC
- pH 7,4

SDS-PAGE vzorkovací pufr (bez 2-merkptoethanolu a bromfenolové modři)

- 60mM Tris (Sigma)
- 2% SDS
- 10% glycerol

PEM

- 200mM PIPES (Sigma)
- 2mM EGTA (Sigma)
- 0,2mM MgSO₄ (Sigma)
- pH 6,9
- autoklávování

PEM-BALG

- 200 ml PEM
- 1% BSA (Sigma)
- 0.1% NaN₃
- 100mM lysin (Sigma)
- 0,5% želatina (Sigma)

Pufry B-D (promývací a eluční)

- 100 mM NaH₂PO₄
- 10 mM Tris-Cl (Sigma)
- 8 mM močovina
- Pufr B -pH 8
- Pufr C – pH 6,3
- Pufr D – pH 5,9
- Pufr E – pH 4,5

Anodový pufr–BN PAGE

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

Katodový pufr–BN PAGE – tmavý

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

Katodový pufr–BN PAGE – světlý

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

4.1.2 Buněčné kultury

4.1.2.1 *Giardia intestinalis*

K pokusům byla použita buněčná kultura trofozoitů organismu *G. intestinalis* pocházející z kmene WB (ATC 30957). Axenická kultura těchto buněk byla kultivována při teplotě 37 °C v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s přidaným 10% hovězím sérem (Gibco) a 0,1% žlučí. Transfekované buněčné linie byly navíc kultivovány s přidaným selekčním antibiotikem puromycinem (54 µg/ml; Gold Biotechnology) nebo G418 (600 µg/ml; Gold Biotechnology).

4.1.2.2 *Escherichia coli*

K pokusům byly použity dva kmeny chemicky kompetentních buněk *E.coli*, konkrétně TOP10 a BL21 (DE3). K namnožení rekombinantní plazmidové DNA pro minipreparaci a midipreparaci byly použity bakteriální buňky TOP10 kultivované v LB médiu s přidavkem selekčního antibiotika. Pro selekci buněk, které obsahovaly námi upravenou plazmidovou DNA, bylo použito antibiotikum ampicilin při koncentraci 100 µg/ml.

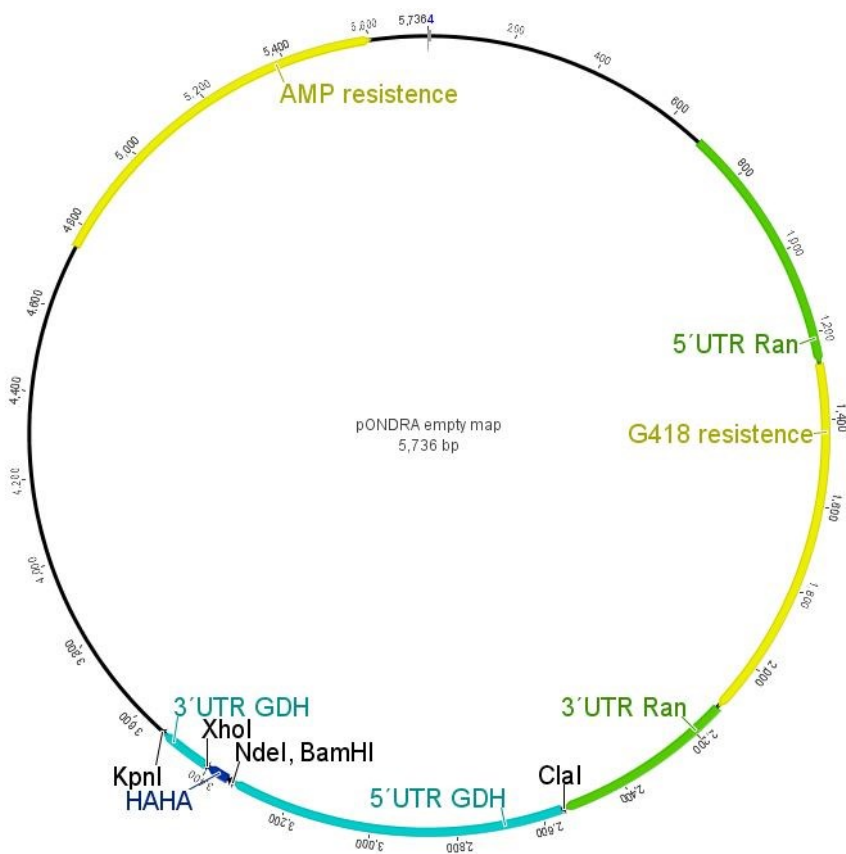
Pro expresi rekombinantního proteinu v bakteriích byly použity buňky *E.coli* kmene BL21(DE3), obsahující profág DE3 odvozený od bakteriofága λ. Pro selekci buněk bylo v tomto případě použito antibiotikum kanamycin o koncentraci 50 µg/ml.

4.1.3 Plazmidy

Pro expresi proteinů v organismu *G. intestinalis* byly použity plazmidy pONDRA a plazmid pTG-IscU-DHFR-C-HAHA (Dolezal et al., 2005, Martinová et al., 2012). Pro expresi proteinů v organismu *E. coli* byl použit plazmid pET-42b.

4.1.3.1 pONDRA

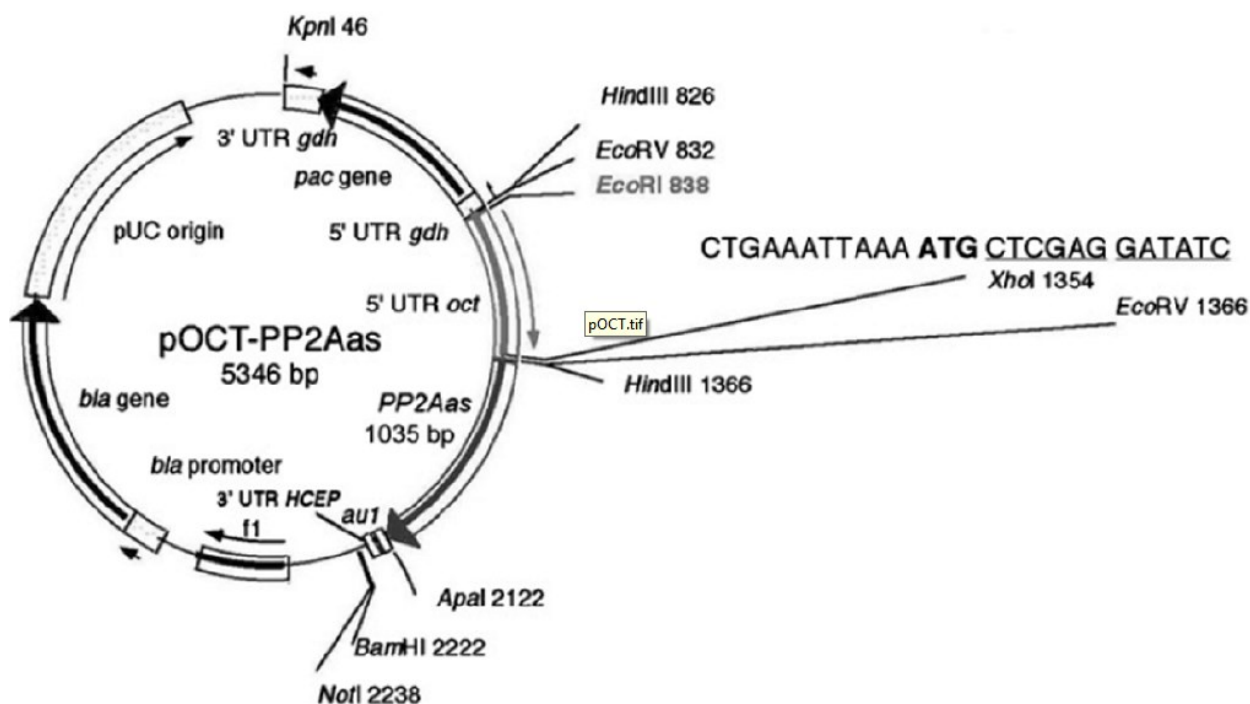
Pro klonování konstruktů sekvence proteinu GL50803_16424 s připojenou sekvencí BAP (biotin akceptor peptide) byl použit plazmid pONDRA (Obr. 7). Jedná se o upravený plazmid pRANneoGDHluc (Sun et al., 1998), ve kterém byl gen pro luciferázu nahrazen sekvencí pro hemaglutininový (HA) tag (Dolezal et al., 2005), obsahující silný promotor, který je součástí 5'-nepřekládané oblasti genu pro glutamát dehydrogenázu (GDH). Velikost plazmidu je 5736 párů bází a obsahuje restriční místa *XhoI*, *BamHI*, *NdeI*, *KpnI* a *Clal*.



Obr. 7: Mapa vektoru pONDRA vyznačenými místy pro štěpení restričními enzymy a místy rezistence proti antibiotikům ampicilin a G418 (vytvořeno: Marková, 2018).

4.1.3.2 pTG-IscU-DHFR-C-HAHA

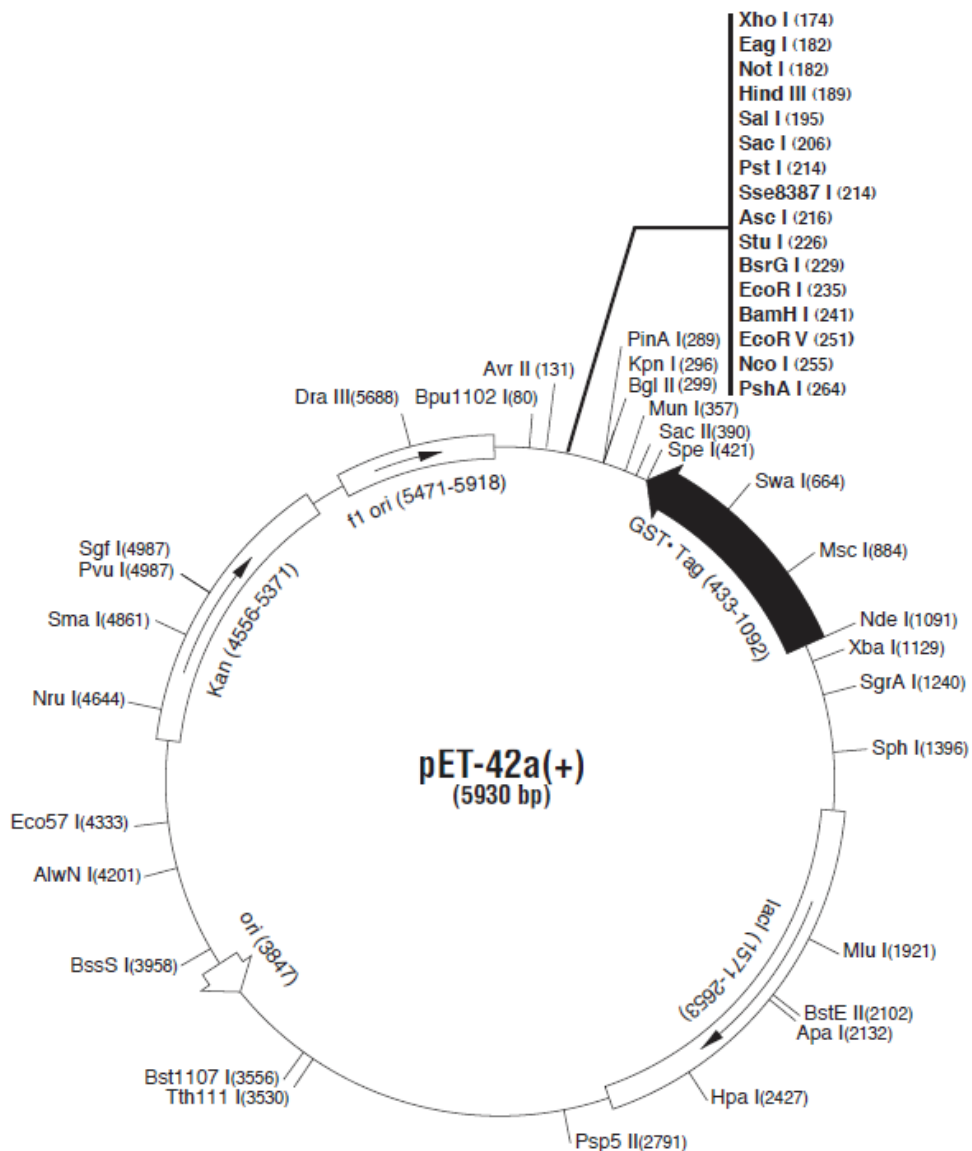
Pro klonování konstruktu sekvence 1. a 2. poloviny proteinu GL50803_16424 s připojenou sekvencí HA-tagu (hemagglutininového) byl použit plazmid pTG-IscU-DHFR-C-HAHA (Obr. 8). Jedná se o plazmid pTG3039 (Lauwaet et al., 2007), který byl upraven tak, aby exprimované proteiny obsahovaly C-terminální hemagglutininový (HA) tag (Martincová et al., 2012). Unikátní restrikční místa v tomto plazmidu jsou *NdeI*, *PstI*, *MluI* a *ApaI*. Velikost upraveného plazmidu je 5568 párů bází.



Obr. 8 Mapa původního vektoru pOCT-PP2Aas (pTG3039) s promotorem který je součástí 5'-nepřekládané oblasti genu pro ornitin-karbamoyl transferázu (Lauwaet et al., 2007).

4.1.3.3 pET-42b

Pro klonování konstruktů sekvence proteinu GL50803_16424 byl použit plazmid pET-42b (Obr. 9). Jedná se o bakteriální typ plazmidu s IPTG indukovatelnou expresí. Tento plazmid obsahuje gen pro kanamycinovou rezistenci. Exprese vloženého genu je řízena bakteriálním T7 promotorem. Velikost plazmidu je 5930 párů bází. Součástí plazmidu jsou i dva polyhistidinové (His) tagy a glutathion-S-transferázový (GST) tag.



Obr. 9: Mapa vektoru pET-42b s vyznačenými místy pro štěpení restričními enzymy a místy rezistence proti antibiotiku kanamycinu. (převzato z <http://www.merckmillipore.com>)

4.2 Metody

4.2.1 Použité bioinformatické nástroje

Pro určení molekulové hmotnosti proteinu byl použit program Compute pI/Mw (Gasteiger et al., 2005). Pro hledání homologních proteinů byl použit software HHpred (Soding et al., 2005; Zimmermann et al., 2018). Pro hledání podobnosti proteinů s již známými proteinovými rodinami byla použita databáze a online nástroj Pfam (Finn et al., 2016). Pro určení lokalizace proteinů byl použit software TargetP, který je založen na predikování přítomnosti N-terminální presekvence (Emanuelsson et al., 2007). Pro vyhledávání transmembránových helixů v proteinu byl použit program TMHMM Server (Krogh et al., 2001). Nástrojem pro predikci proteinové struktury I-TASSER byl vytvořen strukturní model proteinu GL50803_16424 (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008). Obrázek 19 byl upraven procesem dekonvoluce softwarem Huygens Professional verze 18.04 (Scientific Volume Imaging, The Netherlands, [__http://svi.nl__](http://svi.nl)); „signal-to-noise ratio“ (SRN) byl nastaven na hodnotu 13; opakování bylo nastaveno na hodnotu 50. Pro úpravy jasu a barev obrazového materiálu byla použita platforma Fiji, využívající open-source software ImageJ (Schindelin et al., 2012). Statistické operace a obrázek 25 byly zpracovány v programu Perseus verze 1.6.0.7 (Tyanova et al., 2016).

4.2.2 SDS-PAGE

K separaci a ověření přítomnosti proteinů byla použita SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS). Podle doporučeného návodu byl připraven 12% rozlišovací gel a 5% zaostřovací gel. Vzorky byly smíchány s odpovídajícím množstvím 1x koncentrovaného nebo 5x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru a inkubovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Po zatuhnutí byly gely přeneseny do aparatury Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a zality elektroforetickým pufrem. Vzorky byly nanášeny pomocí pipety s prodlouženou špičkou. Napětí pro elektroforézu bylo nastaveno na 90 V do té doby, dokud proteiny nepřekonal hranici mezi rozlišovacím a zaostřovacím gelem. Poté bylo napětí nastaveno na 150 V. Molekulová hmotnost proteinů byla určena pomocí standardu PAGE-Ruler Plus (ThermoFisher).

4.2.3 Western blot

Z gelu byly proteiny přeneseny pomocí zařízení Biometra Fastblot (Analytik Jena) na nitrocelulózovou membránu (GE Healthcare). Proud byl nastaven podle velikosti

gelu – na 1 cm² gelu byl nastaven proud 1,5 mA. Blotování trvalo 75 minut. Poté byla membrána s proteiny blokována přes noc v 5% roztoku sušeného mléka s obsahem 0,25% TWEEN® 20 (Sigma) při teplotě 4 °C. Následně byla membrána inkubována na třepačce 1 hodinu s primární protilátkou naředěnou v roztoku mléka na požadovanou koncentraci (Tabulka 2). Membrána byla propláchnuta 3 x 15 minut v roztoku mléka a inkubována s příslušnou sekundární protilátkou, naředěnou v roztoku mléka na požadovanou koncentraci (Tabulka 3), po dobu 1 hodiny na třepačce. Následně byla opět propláchnuta 3 x 15 minut v roztoku PBS. Membrána s proteiny, pro jejichž značení byla využita sekundární protilátka konjugovaná s HRP (horseradish peroxidase), byla vyvolána v přístroji Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Vyvolávacím substrátem byl Luminata Classico Western HRP substrate (Merck Millipore). Membrána s proteiny, pro jejichž značení byla využita sekundární protilátka konjugovaná s AP (alkalická fosfatáza), byla vyvolána přidáním substrátu směsi BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát) a NTB (nitroblue tetrazolium) a krátkou inkubací při teplotě 37 °C. Při použití membrány PVDF byla membrána před samotným přenesením gelu inkubována 10 sekund v metanolu, 60 sekund v destilované H₂O a poté v blotovacím roztoku. Po přenesení proteinů z gelu byla membrána inkubována 10 minut v 8% kyselině octové, 10 minut v destilované H₂O a blokována v 10% mléce. Pro vyvolání PVDF membrány byl použit stejný postup jako pro membránu nitrocelulóзовou.

Protilátka	Zvíře	Ředění	Firma
anti-HA tag	Krysa	1:2000	Roche
anti- <i>Gi</i> Tom40	Králík	1:5000	Vlastní produkce
anti- GL50803_16424	Krysa	1:2000	Vlastní produkce
anti-BAP	Králík	1:1000	GenScript
anti- <i>Gi</i> lscU		1:500	Vlastní produkce

Tabulka 2: Použité primární protilátky pro vyvolání blotů.

Protilátka	Konjugovaná s	Ředění	Firma
anti-kryší	HRP	1:2000	Invitrogen
anti-králičí	HRP	1:2000	Invitrogen
streptavidin	HRP	1:500	ThermoFisher

Tabulka 3: Použité sekundární protilátky pro vyvolání blotů.

4.2.4 Amplifikace a klonování genů

4.2.4.1 Amplifikace genů

Pro amplifikaci genů byla použita PCR reakce (polymerase chain reaction). Jako templátová DNA byla použita genomová DNA z axenické kultury *G. intestinalis* izolovaná z buněk pomocí komerčně dostupného kitu Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Byly navrženy primery odpovídající sekvenci proteinu GL50803_16424 a použitým restričními místům. Primery byly objednány u firmy Sigma-Aldrich (Tabulka 4).

Primery pro expresi genů v *G. intestinalis*:

Konstrukt proteinu GL50803_16424 s C-terminálně připojenou sekvencí BAP (biotin acceptor peptide)		
	Sekvence	Restriční místa
Forward	5'-CATGCATATGATGAGTAGAACGCCAAAC-3'	<i>NdeI</i>
Reverse	5'-CATGCTCGAGTTACTCGTGCCATTCTATCTTCTGAGCCTC AAAGATGTCATTTAGGCCGTAGCGACGATTACCGGATGA-3'	<i>XhoI</i>

Konstrukt 1. poloviny proteinu GL50803_16424 s C-terminálně připojeným HA tagem		
	Sekvence	Restriční místa
Forward	5'-CTAGCATATGATGAGTAGAACGCCAAACATTG-3'	<i>NdeI</i>
Reverse	5'-CTAGCTGCAGTCTCGTATGCGTTTCTACGTC-3'	<i>PstI</i>

Konstrukt 2. poloviny proteinu GL50803_16424 s C-terminálně připojeným HA tagem		
	Sekvence	Restriční místa
Forward	5'-CTAGCATATGATGAGTAGAACGCCAAACATTG-3'	<i>AseI</i>
Reverse	5'-CTAGCTGCAGTCTCGTATGCGTTTCTACGTC-3'	<i>SbfI</i>

Primery pro expresi genů v *E.coli*:

Konstrukt proteinu GL50803_16424 s C-terminálně připojeným polyhistidinovým (His) tagem		
	Sekvence	Restriční místa
Forward	5'-CTAGATTAATATGGCAATAGGCGACAAGTACAT-3'	<i>AseI</i>
Reverse	5'-CTAGCCTGCAGGGTAGCGACGATTACCGGAT-3'	<i>XhoI</i>

Tabulka 4: Přehled použitých primerů.

Složení PCR reakce (celkový objem 25 μ l):

- 5 μ l 5x koncentrovaný Q5 reaction buffer (New England Biolabs)
- 0,25 μ l Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs)
- 0,5 μ l 10mM dNTPs
- 1,25 μ l 10 μ M forward primer
- 1,25 μ l 10 μ M reverse primer
- 1 μ l templátová DNA
- 15,75 μ l H₂O

Podmínky průběhu PCR reakce jsou uvedeny v tabulce 5.

Teplota (°C)	Inkubační doba (s)	Počet opakování
98	30	1
98	10	30
60	20	30
72	40	30
72	120	1
4	-	-

Tabulka 5: Podmínky PCR reakce.

4.2.4.2 Klonování genů

Ověření úspěšné PCR reakce bylo provedeno agarózovou horizontální elektroforézou. Pro elektroforézu byl použit 1% agarózový gel (0,5 g agarózy, 50 ml TAE pufru) s přidanými 50 μ l barviva SYBER Safe (ThermoFisher). Ke vzorkům byl přidán vzorkovací pufr (DNA Gel loading dye; ThermoFisher). Pomocí UV transiluminátoru byly detekovány nukleové kyseliny. Velikost DNA fragmentů byla určena podle standardu GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher). Pro získání DNA z gelu byl použit komerčně dostupný QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) Požadovaný fragment (inzert) a příslušný plazmid (vektor) byly štěpeny restrikcčními enzymy (New England Biolabs) dle příslušného protokolu. Vektor i inzert byly po restrikcční reakci přečištěny komerčně dostupným kitem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Naštěpený vektor i inzert byly poté ligovány T4 DNA ligázou (New England Biolabs) dle příslušného protokolu.

4.2.5 Transformace bakterií *E.coli*

Pro transformaci buněk bakterie *E.coli* byly použity kompetentní buňky kmene TOP 10. Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 20 μ l ligační reakce. Buňky byly inkubovány nejprve na ledu po dobu 20 minut, následně při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a poté opět 5 minut na ledu. K buňkám bylo přidáno 250 μ l SOC média a byly indukovány 1 hodinu na třepačce při teplotě 37 °C, 220 RPM. Bakterie byly rozetřeny na plotně s LB médiem, ošetřené příslušným selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Vybrané narostlé kolonie byly resuspendovány v 50 μ l destilované vody. V 10 μ l této suspenze byly bakterie degradovány střídáním teploty a použity jako templátová DNA pro otestování přítomnosti plazmidu s příslušným fragmentem pomocí PCR metody. Pro tuto PCR reakci byl použit mix SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio). Reakce proběhla za podmínek uvedených v příslušném protokolu. Přítomnost fragmentu byla ověřena na horizontální agarózové elektroforéze.

Pozitivní kolonie (zbylých 40 μ l suspenze) byly inkubovány přes noc v 5 ml LB média s obsahem příslušného selekčního antibiotika na třepačce při teplotě 37 °C, 220 RPM. Pro izolaci plazmidu z této bakteriální kultury byl použit komerčně dostupný kit High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid). Čistota a koncentrace takto získané plazmidové DNA byla změřena spektrofotometrem NanoDrop TM 1000. Následně bylo provedeno zpětné vyštěpení inzertu příslušnými restrikčními enzymy a produkt restrikčního štěpení byl analyzován na agarózovém gelu horizontální elektroforézou. V případě vyštěpení inzertu o správné velikosti byla DNA osekvenována.

V případě, že byl inzert správně zaklonován do vektoru, byl tento plazmid namnožen. K 200 μ l kompetenčních bakterií *E. coli* kmene TOP10 bylo přidáno 5 μ l plazmidové DNA a buňky byly inkubovány nejprve na ledu po dobu 20 minut, následně při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a poté opět 2 minut na ledu. Buňky byly poté přidány do 100 ml LB média s obsahem příslušného antibiotika a indukovány na třepačce při teplotě 37 °C, 220 RPM. Po 16 hodinách byl z těchto bakterií izolován plazmid pomocí komerčně dostupného kitu Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Kvalita a koncentrace plazmidové DNA byla změřena spektrofotometrem NanoDrop TM 1000.

4.2.6 Transfekce buněk *G. intestinalis*

Narostlé buněčné kultuře trofozoitů požadovaného kmene *G. intestinalis*, v objemu 70 ml kultivačního média TYI-S-33, bylo vyměněno médium za sterilní a vychlazený PBS roztok, kultura byla zchlazena na ledu po dobu 30 minut. Buněčná kultura byla poté centrifugována při otáčkách 1000 G, teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v 500 µl kultivačního sterilního média TYI-S-33. Pomocí přístroje COULTER COUNTER (Beckman) byla změřena koncentrace buněk a bylo přidáno takové množství média, aby celková koncentrace buněk byla $3,3 \times 10^7$ na 1 ml. 300 µl této buněčné suspenze bylo odebráno do elektroporační 4mm kyvety (Bio-Rad). K této suspenzi bylo přidáno 50 µg plazmidové DNA a inkubováno 10 minut na ledu. Elektroporace byla provedena pomocí přístroje Gene Pulser (Bio-Rad) a to při nastavení „exponencionálního protokolu“: 350 V, 1000 µF, 750 Ω a šířky kyvety 4 mm. Po elektroporaci byly buňky v kyvetě inkubovány na ledu po dobu 5 minut. Následně byl obsah kyvety přenesen do zkumavky s 10 ml kultivačního média TYI-S-33 bez přidání selekčních antibiotik a buňky byly kultivovány při 37 °C. Po 24 hodinách bylo do média přidáno selekční antibiotikum (150 µg/ml G418 a/nebo 27 µg/ml puromycinu). Za další dva dny bylo médium vyměněno a přidána vyšší dávka selekčního antibiotika (600 µg/ml G418 a/nebo 54 µg/ml puromycinu). Po vytvoření celistvé vrstvy buněk po stěně zkumavky bylo možné buňky přeočkovávat standartním způsobem.

4.2.7 Frakcionace trofozoitů *G. intestinalis*

Narostlá buněčná kultura trofozoitů *G. intestinalis* byla centrifugována (médium bylo vyměněno vychlazeným PBS roztokem (4 °C)) při otáčkách 1000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. K peletu bylo přidáno 15 ml SM pufru a opět provedena centrifugace při otáčkách 1000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v 1 ml SM pufru obohaceném o inhibitory proteáz TLCK (N-tosyl-L-lysin-chlormetyl keton) o koncentraci 50 µg/ml a leupeptinu o koncentraci 10 µg/ml. Poté byly buňky lyzovány sonikátorem Q125 Sonicator (Qsonica) při amplitudě 40 % po dobu 30 sekund a impulsem po 1 vteřině. Sonikace byla provedena celkem třikrát. Po sonikaci byl lyzovaný vzorek centrifugován při otáčkách 2680 G teplotě 4 °C po dobu 20 minut. Část supernatantu byla odebrána jako celkový buněčný lyzát. Zbýlý supernatant byl dále centrifugován při 180000 G, 4 °C po dobu 30 minut. Nově vzniklý supernatant byl odebrán a označen jako cytosolická frakce. Pelet byl resuspendován v 1 ml SM pufru (s přidáním inhibitory proteáz TLCK a leupeptinem) a označen jako frakce HSP. Všechny frakce byly uchovávány při teplotě -80 °C.

4.2.8 Crosslinkování proteinů

Pro tento pokus byly použity HSP frakce buněk exprimující tagovaný protein GL50803_16424-BAP a buněk exprimující cytosolickou biotin ligázu (BirA) resuspendované v SM pufru. Postup crosslinkování byl pro frakce obou kultur stejný. Všechno roztoky a pufrы použité pro tento experiment byly obohaceny o inhibitory proteáz cOmplete, Mini, EDTA-free (Sigma). Den před frakcionací těchto buněk byl do média přidán 50 μ M biotin. Pomocí Bio-rad protein assay kit (Biorad) byla dle příslušného protokolu změřena koncentrace proteinů v HSP frakcích. Nejprve bylo odebráno 20 μ l směsi HSP v SM pufru a označeno jako A0 kontrola. Zbylý objem byl centrifugován při otáčkách 30000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v takovém množství PBS, aby výsledná koncentrace proteinů ve směsi byla 1,5 mg/ml. Ke směsi byl přidán 50 μ M crosslinker DSP (dithiobis (succinimidyl propionát); ThermoFisher), naředěný v DMSO (dimethylsulfoxid), a směs byla indukována na ledu po dobu 1 hodiny. Reakce byla zastavena přidáním 50mM Trisu (pH 7,4) a inkubací při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Vzorek byl opět centrifugován při otáčkách 30000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v takovém množství „Boiling“ pufru, aby koncentrace proteinů byla 1,5 mg/ml, a inkubován při teplotě 80 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při otáčkách 30000 G pokojové teplotě po dobu 10 minut. Pelet byl ponechán a označen jako kontrola A1 a 200 μ l supernatantu bylo označeno jako kontrola A2. Zbylý supernatant byl zředěn 10x v „Incubation“ pufru a 200 μ l odebráno a označeno jako kontrola A3. Bylo promyto 20 μ l magnetických kuliček Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (ThermoFisher) rotováním v 1 ml „Incubation“ pufru po dobu 5 minut (provedeno celkem 3x). Magnetické kuličky byly přidány ke vzorku zředěnému v inkubačním pufru a inkubovány na rotátoru při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin. Před promytím magnetických kuliček bylo odebráno 200 μ l vzorku a označeno jako kontrola A4. Promytí probíhalo rotací vzorku na rotátoru, centrifugací vzorku na stolní centrifuze a separací kuliček na magnetickém stojánku. Kuličky byly promývány rotací v 700 μ l „Incubation“ pufru (obohaceném o 0,1% SDC) po dobu 5 minut (provedeno celkem 3x). Následně bylo provedeno promytí kuliček ve 100 μ l „Boiling“ pufru (ve složení pufru bylo 1% SDS nahrazeno 1% SDC) po dobu 5 minut. Ponecháno 100 μ l jako kontrola A5. Bylo provedeno promytí kuliček rotací ve 100 μ l SDS-PAGE vzorkovacího pufru bez 2-merkptoethanolu a bromfenolové modře (ve složení pufru bylo 2% SDS bylo nahrazeno 2% SDC) po dobu 5 minut. Ponecháno 100 μ l jako kontrola A6. Kuličky byly promývány rotací

v 700 µl „Incubation“ pufru (obohaceném o 0,1% SDC) po dobu 5 minut (provedeno celkem 2x). (V tomto posledním promytí bylo odebráno 100 µl vzorku (po rotaci), zvlášť centrifugováno, separováno. K těmto kuličkám bylo přidáno 20 µl 1x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru (obohaceném 20mM biotinem) a vzorek inkubován při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Označeno jako kontrola A7). „Suché“ magnetické kuličky byly předány na analýzu proteinů na hmotnostní spektrometr. Jako kontrola pro porovnání množství výsledných proteinů vzorku crosslinkovaného proteinu GL50803_16424-BAP byl použit vzorek obsahující pouze cytosolickou biotin ligázu (BirA).

4.2.9 Hmotnostní spektrometrie

Analýza hmotnostní spektrometrie byla provedena kolegy z laboratoře hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu metodou MALDI TOF.

4.2.10 Fixace buněk metanolem/acetone

Mezi dvě podložní sklička byl umístěn silikon a vzniklý volný prostor byl naplněn narostlou buněčnou kulturou trofozoitů *G. intestinalis*. Buňky byly inkubovány 15 minut při teplotě 37 °C. Následně byla skla rozmontována a nadbytečné médium odsáto. Oblast s buňkami se poté nechala lehce zaschnout (do ½ oblasti) a byla provedena fixace buněk ve zchlazeném metanolu (-20 °C) po dobu 5 minut a následně ve zchlazeném acetonu (-20 °C) opět po dobu 5 minut.

4.2.11 Imunofluorescenční značení metanolem/acetone fixovaných preparátů

Zafixované buňky na podložních skličkách byly přes noc blokovány 700 µl blokovacího roztoku ve „vlhké komůrce“ při teplotě 4 °C. Poté byly buňky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě s primární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku na požadovanou koncentraci (Tabulka 6). Promytí preparátů bylo provedeno aplikací 700 µl PBS roztoku po dobu 10 minut. Tento krok byl proveden třikrát. Následně byla provedena inkubace s příslušnou sekundární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku na požadovanou koncentraci (Tabulka 7) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a bez přístupu světla. Odmytí sekundární protilátky bylo provedeno stejným způsobem jako v případě protilátky primární, avšak chráněno před světlem. Pro dokončení preparátů bylo na zafixované buňky po promytí aplikováno 15 µl montovacího média VectaShield (Vector) s obsahem DAPI, přiklopeny krycím skličkem, přebytečný objem byl odsát buničinou a okraje krycího sklička zafixovány lakem na nehty. Pro běžná mikroskopická pozorování byl

použit mikroskop Nikon Eclipse Ti-S (zvětšení 1000x), pro konfokální mikroskopii bylo použito zařízení Leica SP8 Upright.

Protilátka	Zvíře	Ředění	Firma
anti-HA tag	Krysa	1:1000	Roche
anti-Tom40	Králík	1:1000	Vlastní produkce
anti-GL50803_9296	Králík	1:2000	Vlastní produkce
anti- GL50803_16424	Krysa	1:2000	Vlastní produkce

Tabulka 6: Použité primární protilátky pro mikroskopické experimenty.

Protilátka	Konjugovaná s	Ředění	Firma
anti-kryší	Alexa®fluor 488	1:1000	Invitrogen
anti-kryší	Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen
anti-králičí	Alexa®fluor 488	1:1000	Invitrogen
anti-králičí	Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen
streptavidin	Alexa®fluor 488	1:500	Invitrogen

Tabulka 7: Použité sekundární protilátky pro mikroskopické experimenty.

4.2.12 Fixace buněk paraformaldehydem

K narostlé buněčné kultuře trofozoitů *G. intestinalis* byl do média přidán 1% paraformaldehyd. Poté byly buňky inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci byly buňky centrifugovány při otáčkách 1000 G teplotě 21 °C po dobu 5 minut. K peletu bylo přidáno 5 ml PEM roztoku a provedena centrifugace při 1000 G teplotě 21 °C po dobu 5 minut. Nový pelet byl resuspendován v potřebném množství PEM roztoku (150 µl na sklíčko). Suspenze buněk v PEM roztoku byla rozetřena na krycí sklíčka (umístěné v kultivační misce) předem ošetřené polylysinem (5 µl polylysinu na sklíčko) a nechala se schnout po dobu 15 minut. Následně bylo přebytečné množství buněčné suspenze odsáto a sklíčko bylo ošetřeno 1 ml 0,1% tritonem X-100

naředěným v PEM roztoku. Po inkubaci tritonem byla sklíčka promyta 3x30 sekund PEM roztokem.

4.2.13 Imunofluorescenční značení paraformaldehydem fixovaných preparátů

Zafixované buňky na podložních sklíčkách byly blokovány 500 μ l roztoku PEMBALG. Poté byly buňky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě primární protilátkou naředěnou v PEMBALG roztoku na požadovanou koncentraci (Tabulka 6). Promytí preparátů bylo provedeno aplikací 500 μ l PEM roztoku po dobu 1x5, 1x10 a 1x15 minut. Následně byla provedena inkubace příslušnou sekundární protilátkou naředěnou v PEMBALG roztoku na požadovanou koncentraci (Tabulka 7) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a bez přístupu světla. Odmytí sekundární protilátky bylo provedené stejným způsobem jako v případě protilátky primární, avšak chráněno před světlem. Pro dokončení preparátů bylo na podložní sklíčko aplikováno 15 μ l montovacího média VectaShield (Vector) s obsahem DAPI, přiklopeny krycím sklíčkem s buňkami, přebytečný objem byl odsát buničinou a okraje krycího sklíčka zafixovány lakem na nehty.

4.2.14 Příprava preparátu pro superrezoluční mikroskopii STED

Buňky trofozoitů *G. intestinalis* byly zafixovány paraformaldehydem (viz kapitola 4.2.10) a blokovány 500 μ l roztoku PEMBALG. Poté byly buňky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě primární protilátkou naředěnou v PEMBALG roztoku na požadovanou koncentraci. Promytí preparátů bylo provedeno aplikací 200 μ l PEM roztoku po dobu 4x10 minut. Následně byla provedena inkubace příslušnou sekundární protilátkou určenou pro STED mikroskopii (Abberior Star 588, Abberior Star 635P; Abberior) naředěnou v PEMBALG roztoku na požadovanou koncentraci (1:100) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a bez přístupu světla. Odmytí sekundární protilátky bylo provedené stejným způsobem jako v případě protilátky primární, avšak chráněno před světlem. Poté bylo na sklíčko podle příslušného návodu aplikováno montovací médium TDE Mounting Medium (Abberior). Hotový preparát byl pozorován na mikroskopu Nikon Ti-E s nástroji pro STED mikroskopii (Abberior).

4.2.15 Exprese rekombinantního proteinu

Ke kompetentním buňkám bakterie *E.coli* kmene BL21 (DE3) bylo přidáno 5 μ l plazmidové DNA pET-42b s vloženým konstruktem obsahující sekvenci proteinu GL50803_16424 a sekvenci polyhistidinového tagu (His-tag). Buňky byly inkubovány nejprve na ledu po dobu 20 minut, následně při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund a poté opět 5 minut na ledu. K buňkám bylo přidáno

200 μ l SOC média a byly indukovány 1 hodinu při teplotě 37 °C. Bakterie byly dále kultivovány na plotně s LB médiem, ošetřené antibiotikem kanamycin (50 μ g/ml), při teplotě 37 °C po dobu 20 hodin. Následně byla narostlá kolonie bakterií resuspendována v 5 ml LB média s přidanými 5 μ l kanamycinu a kultivována při teplotě 37 °C na třepačce po dobu 20 hodin. Bakteriální kultura byla dále kultivována v objemu 500 ml LB média (bez přidání antibiotika) na třepačce při teplotě 37 °C, a to doté doby, dokud nedosáhla optická densita (OD) bakterií v médiu hodnoty v rozmezí 0,6-0,8. OD byla měřena pomocí spektrometru. Při dosažení hodnoty OD 0,7 bylo do média přidán 1 mM IPTG (izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid). Po 4 hodinách po indukci byla bakteriální kultura centrifugována při otáčkách 6000 G, teplotě 21 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v 10 ml sterilního PBS roztoku a opět centrifugován při otáčkách 6000 G teplotě 21 °C po dobu 10 minut. Veškerý supernatant byl odsát a suchý pelet uchován pro další zpracování při teplotě -80 °C.

4.2.16 Izolace a purifikace rekombinantního proteinu

Pelet z předchozího kroku byl resuspendován ve 20 ml pufru B. Poté byly buňky lyzovány sonikátorem při amplitudě 60 % po dobu 40 sekund a impulsem po 1 vteřině. Lyzované buňky byly centrifugovány při otáčkách 4960 G teplotě 21 °C po dobu 15 minut. Čistý supernatant byl přenesen do nové falkony a opět centrifugován při otáčkách 4960 G teplotě 21 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl přenesen do ultracentrifugační zkumavky (Beckman Coulter) a centrifugován při otáčkách 100000 G, teplotě 4 °C po dobu 1 hodinu. Supernatant byl smíchán s předem promíchanou (rotovanou 15 minut) směsí 7 ml pufru B a 1 ml Ni-NTA agarózy (Thermo Fisher). Smíchaná směs byla rotována 1 hodinu na rotátoru. Po inkubaci byla tato směs přenesena do kolony a byl sbírán proteklý objem. Postupně byla kolonka s agarózou promývána 2 x 4 ml pufru C (promývací), 6 x 0,5 ml pufru D (eluční) a 6 x 0,5 ml pufru E (eluční). Proteklý objem byl jednotlivě sbírán. Dva sloučené eluční vzorky (objem 1 ml + 250 μ l 5x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru) s nejvyšším obsahem fúzního proteinu byly separovány pomocí SDS-PAGE metody při použití systému VS20WAVE Maxi (Clever scientific). Elektroforéza byla provedena při teplotě 4 °C při napětí 150 V (po 30 minutách nastaveno na 250 V) po celkovou dobu 5 hodin. Z gelu obarveného v Coomassie brilliant blue byl vyříznut band s proteinem a promýván nejprve v dH₂O (1 hod), 2x sterilní PBS roztokem (1 hod a poté 12 hod při 4 °C). Následně byl gel s malým množstvím sterilního PBS roztoku (cca 1 ml) homogenizován ručním homogenizátorem (Dounce). Homogenizovaný roztok byl rozdělen do 6 zkumavek a doplněn

do 2 ml objemu sterilním PBS roztokem. Tyto směsi s proteinem byly použity jako antigen pro imunizaci potkanů. Po přibližně 10 týdnech bylo otestováno sérum odebrané po třetí imunizaci. Po čtvrté imunizaci byla získána hotová protilátka. Imunizaci potkanů a odběr sér provedl Jan Mach z katedry parazitologie, BIOCEV.

4.2.17 Zkouška proteázou trypsinem

HSP frakce byla naředěna SM médiem (obohaceným o inhibitory proteáz) tak, aby byla koncentrace proteinů 7,5 mg/ml. Z tohoto vzorku byly připraveny celkem tři reakce ve složení uvedeném v tabulce 8.

1	2	3
20 µl HSP	20 µl HSP	20 µl HSP
30 µl SM pufru + inhibitory	30 µl SM média + inhibitory	30 µl SM média + inhibitory
	2 µl Trypsinu (5 mg/ml)	2 µl Trypsinu (5 mg/ml)
		5 µl 1% Tritonu (=0,1%)

Tabulka 8: Složení tří vzorků použitých v experimentu – zkouška proteázou trypsinem.

Po promíchání byly směsi inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Ke vzorkům bylo přidáno 50 µl 1x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru a vzorky byly inkubovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Následovala analýza vzorků na SDS-PAGE elektroforéze.

4.2.18 Extrakce uhličitánem sodným

Bylo smícháno 200 µl 0,1M Na₂CO₃ s 50 µl HSP frakce (membránový pelet resuspendovaný v SM médiu s inhibitory proteáz) a inkubováno na ledu po dobu 30 minut. Během inkubace na ledu byla směs důkladně míchána pomocí vortex mixéru po dobu 1 minuty každých 5 minut. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při otáčkách 100000 G teplotě 4 °C po dobu 30 minut. K supernatantu byla přidána kyselina trichloroctová (Lach-ner), v takovém množství, aby její konečná koncentrace ve vzorku byla 20 %, a vzorek byl inkubován na ledu po dobu 30 minut. Pelet byl resuspendován v 50 µl 1x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru a inkubován při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci supernatantu s kyselinou trichloroctovou byl vzorek centrifugován při otáčkách 30000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant byl odsát a k peletu bylo přidáno 0,5 ml zchlazeného acetonu (4 °C), vzorek byl opatrně promíchán. Vzorek byl opět centrifugován při otáčkách 30000 G teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant (aceton) byl po centrifugaci odsát. Krok promytí acetonem byl proveden celkem dvakrát. Pelet byl

inkubován při teplotě 95 °C po dobu přibližně 2 minut (aceton musí být odpařen). Suchý pelet byl resuspendován ve 100 µl 1x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru a inkubován při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Při změně barvy vzorku po přidání 1x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru byl vzorek titrován přidáním Trisu (tris(hydroxymethyl)aminomethanu) (pH 7,4) do barvy bromfenolové modře. Následovala analýza vzorku na SDS-PAGE elektroforéze.

4.2.19 Modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE)

Pro modrou nativní elektroforézu byla použita HSP frakce trofozoitů *G. intestinalis* exprimujících protein GL50803_16424 značený hemaglutininovým (HA) tagem. Byla změřena koncentrace proteinů v HSP frakci. Z tohoto vzorku byly připraveny celkem 4 reakce, s různou koncentrací digitoninu a s různým množstvím proteinů v HSP frakci (Tabulka 9).

množství proteinu v HSP frakci	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
koncentrace digitoninu	0,5 %	0,5 %	1 %	1 %
HSP frakce (µl)	14	26	14	26
4x konc. vzorkovací pufr (µl)	10	10	10	10
10% digitonin (µl)	2	2	4	4
dH ₂ O (µl)	14	2	12	0
celkový objem reakce	40	40	40	40

Tabulka 9: Složení vzorků použitých v experimentu – modrá nativní elektroforéza.

Následně byly připravené reakční směsi promíchány pipetou a inkubovány na ledu po dobu 15 minut. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při otáčkách 20000 G teplotě 4 °C po dobu 30 minut. K 18 µl supernatantu bylo přidáno 0,5 µl NativePAGE 5% G-250 Sample Additive (Invitrogen) a 1,5 µl dH₂O. Vzorky byly nanášeny do jamek gelu NativePAGE™ 4-16% Bis-Tris (Invitrogen) připraveného v elektroforetické aparatuře. Gel byl zalit připraveným tmavým katodovým pufrům (mezi skla) a anodovým pufrům (vně skla). Elektroforéza byla provedena při teplotě 4 °C, proudu 1 mA a za postupného zvyšování napětí od 50 V až po 120 V. Po 2 hodinách byla elektroforéza přerušena a byl vyměněn tmavý katodový pufr za světlý katodový pufr pro lepší vizualizaci gelu. Celková doba trvání elektroforézy byla přibližně 4 hodiny. Molekulová hmotnost proteinů byla určena pomocí standardu NativeMARK™ (Invitrogen). Gel byl za použití metody western blot přenesen na PVDF (polyvinylidene difluorid) membránu.

5 Výsledky

5.1 Charakterizace proteinu GL50803_16424 *in silico*

Pro charakterizaci proteinu GL50803_16424 byly použity veřejně dostupné online bioinformatické nástroje (viz kapitola 4.2.1) (Tabulka 10). Jako vstupní informace pro tyto nástroje byla použita známá proteinová sekvence uvedená v databázi GiardiaDB (Aurrecochea et al., 2009). Protein GL50803_16424 má proteinovou sekvenci dlouhou 252 aminokyselin a předpokládaná molekulová hmotnost je 29,7 kDa. V tomto proteinu nebyla odhalena přítomnost transmembránových helixů. Podle softwaru na hledání proteinových rodin a domén Pfam byl protein GL50803_16424 zařazen do proteinové rodiny myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein (ID proteinové rodiny: Mlf1IP; číslo proteinové rodiny: PF10248; E-value: 2.1e-06) označované podle proteinu myeloid leukemia factor 1. Stejný výsledek určil i program HHpred, avšak s lepší hodnotou E-value: 2.8e-29. Byla určena 21% identita proteinu GL50803_16424 s lidským proteinem „myeloid leukemia factor“. Dle doménové databáze Pfam je proteinová doména Mlf1IP u eukaryot hojně zastoupená v říši živočichů, v menší míře u podříše zelených rostlin. Z řádu diplomonád lze najít tuto proteinovou doménu, kromě *G. intestinalis*, i u mikroaerobního parazita *Spiroucleus salmonicida*.

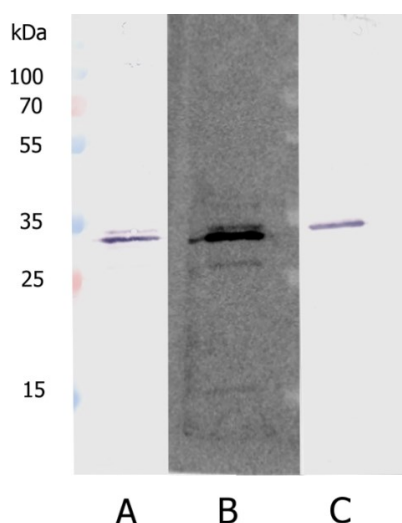
Délka proteinu	252 AK
Molekulová hmotnost	29,7 kDa
Predikované transmembránové helixy	žádné
Predikovaná lokalizace	0,83 jiná
Predikovaná proteinová rodina/doména - Pfam	myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein (Mlf1IP) (E-value: 2.1e-06)
Predikce homologních proteinů/domén - HHpred (hledáno proti databázi Pfam)	myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein (E-value: 2.8e-29)

Tabulka 10: Souhrn výsledků bioinformatické analýzy proteinu GL50803_16424.

Nástrojem pro predikci proteinové struktury I-TASSER byly vytvořeny potenciální 3D modely struktury proteinu GL50803_16424. 3D modely byly navrženy na základě sekvenční podobnosti s proteiny se známou strukturou, další proteinové vlastnosti nebyly zohledňovány. Pro protein GL50803_16424 byla určena největší strukturní podobnost s proteinovou strukturou oktamerního proteinového komplexu exocystu, s identifikačním označením v databázi PDB: 5YFP,

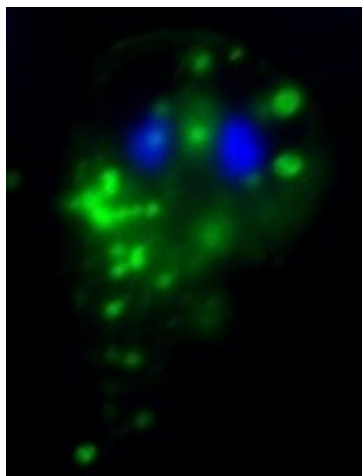
5.2 Vytvoření transfekované linie *G. intestinalis* s GL50803_16424-BAP

Pro vizualizaci proteinu GL50803_16424 v buňkách *G. intestinalis* a pro možnost tento protein experimentálně zkoumat byla DNA sekvence proteinu GL50803_16424 s C-koncově připojenou DNA sekvencí biotin akceptorového peptidu (BAP) amplifikována pomocí PCR metody. Amplifikovaná DNA byla vložena do plazmidového vektoru pONDRA skrze restrikční místa *NdeI* a *XhoI*. Správnost sekvence upraveného plazmidu byla potvrzena jeho osekvenováním. Plazmid pONDRA obsahující sekvenci GL50803_16424 s připojenou sekvencí BAPu byl použit pro transfekci buněk *G. intestinalis*, které stabilně epizomálně exprimovaly biotin ligázu (BirA) (Martincová et al., 2015). Na lyzátu buněk trofozoitů transfekované linie byla ověřena exprese fúzního proteinu GL50803_16424-BAP a exprese enzymu BirA značenou dvojitým HA tagem (Obr. 12); exprese proteinu GL50803_16424-BAP v buňce byla ověřena i imunofluorescenčně (Obr. 13).



Obr. 12: Western blot zobrazující expresi fúzního proteinu GL50803_16424 s biotin akceptorovým peptidem (BAP) po transfekci buněk *G. intestinalis* exprimující BirA vektorem pONDRA (A, B). Plazmid pONDRA obsahuje námi vložený insert GL50803_16424-BAP, jehož přítomnost byla ověřena na blotu vyvolaného protilátkou anti-BAP (A) a na blotu vyvolaného pomocí streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou (HRP) (B).

Blot zobrazující expresi BirA vyvolaný protilátkou anti-HA (C).



Obr. 13: Buňka trofozoita *G. intestinalis* exprimující GL50803_16424-BAP/BirA. GL50803_16424-BAP byl značen streptavidinem konjugovaným s Alexa Fluor® 488 (zeleně); jaderná DNA značená pomocí DAPI (modře).
(modře).

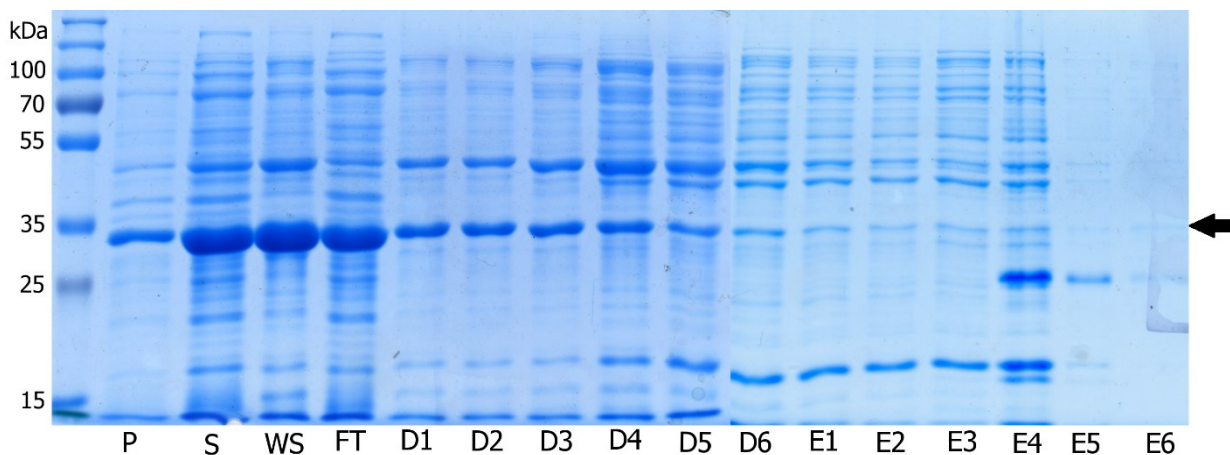
5.3 Lokalizace proteinu GL50803_16424 ve WB buňkách *G. intestinalis*

Lokalizace proteinu GL50803_16424 byla již dvakrát určena epizomální expresí fúzního proteinu s GFP a epizomální expresí HA-tagovaného GL50803_16424 (viz kapitola 2.3), ovšem s rozdílnými výsledky (Hagen et al., 2011; Martincová et al., 2015). Pro ověření lokalizace proteinu GL50803_16424 v buňkách trofozoitů divokého kmene *G. intestinalis* (WB) bylo nutné vytvoření specifické protilátky proti přirozenému proteinu GL50803_16424.

5.3.1 Exprese rekombinantního proteinu v buňkách *E. coli*

Sekvence DNA proteinu GL50803_16424 byla amplifikována metodou PCR. Amplifikovaná DNA byla vložena do plazmidového expresního vektoru pET-42b skrze restrikční místa *AseI* a *XhoI*. Správnost sekvence upraveného plazmidu byla potvrzena jeho osekvenováním. Plazmidem pET-42b obsahující sekvenci proteinu GL50803_16424 následovanou sekvencí pro polyhistidinový tag (His-tag; je součástí plazmidu pET-42b) byly transformovány buňky *E. coli* kmene BL21 (DE3). Úspěšně transformované bakteriální buňky byly kultivovány v 0,5 l LB média. Exprese rekombinantního proteinu byla indukovaná přidáním 1 mM IPTG do média. Pro purifikaci expresního proteinu z této bakteriální kultury byla použita Ni-NTA agarózová matrice afinitní k histidinovému tagu. Protein byl dále přečištěn a eluován z matrice. Frakce z těchto procesů byly testovány pomocí SDS-PAGE (Obr. č. 14). Nejvhodnější frakce (velké množství proteinu ve frakci a čistota frakce) D1, D2 a D3 byly spojeny a použity pro vyříznutí proteinu GL50803_16424 z gelu

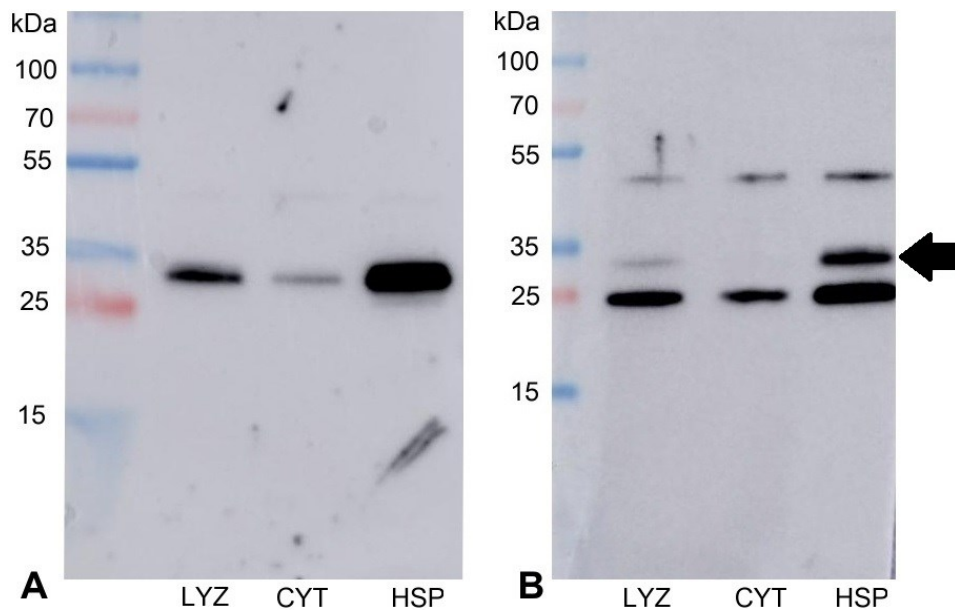
získaného z velkoformátové SDS-PAGE těchto frakcí. Izolovaný protein byl ve formě gelu zaslán firmě Clonestar na výrobu polyklonální králičí protilátky. Přítomnost proteinu GL50803_16424 v gelu byla ověřena analýzou hmotnostní spektrometrií. Homogenizovaný gel s izolovaným proteinem byl také použit pro imunizaci potkanů, ze kterých byla získána druhá polyklonální protilátka (viz kapitola 4.2.16).



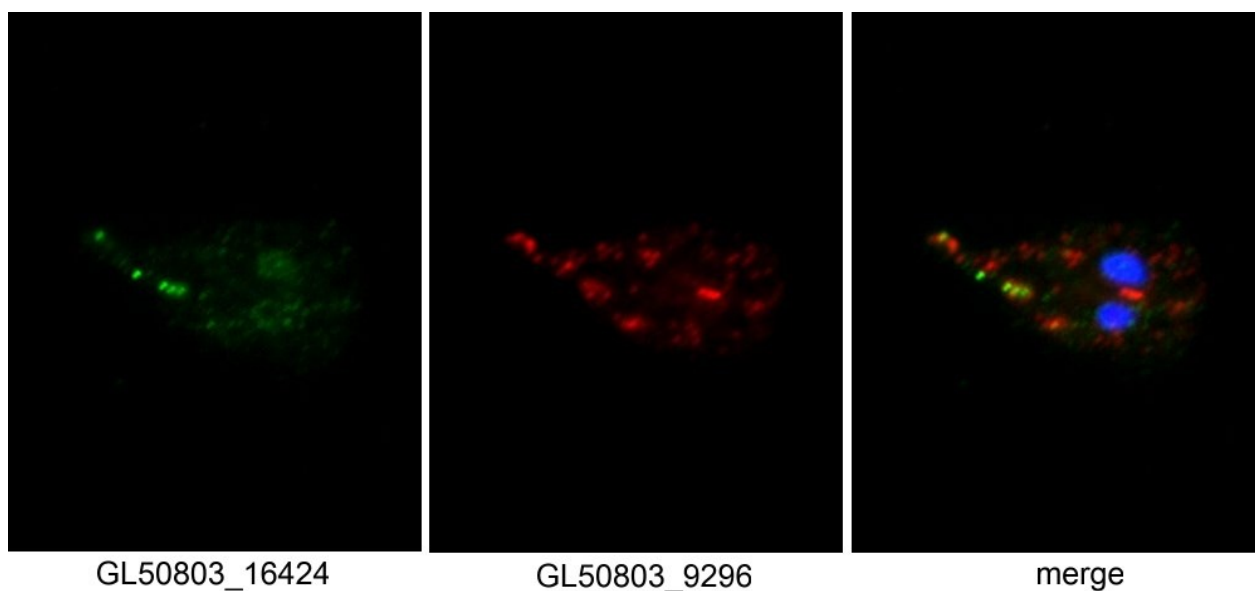
Obr. 14: SDS-PAGE zobrazující množství a čistotu jednotlivých frakcí získaných při izolaci rekombinantního proteinu GL50803_16424. Pelet (P) a supernatant (S) získaný po centrifugaci lyzátu bakteriální kultury exprimující GL50803_16424 ukázal přítomnost proteinu před následnou purifikací. Frakce získaná po první aplikaci vzorku na kolonu (FT) a frakce získaná pro promytí Ni-NTA matrice Wash pufrem (WS) obsahovala značné množství proteinu GL50803_16424, který nebyl zachycen na matrici. Následné eluční kroky umožnily získat čistější vzorky proteinu GL50803_16424 se stále ještě dostatečným množstvím tohoto proteinu. Uvolnění proteinu z matrice docházelo po přidání roztoků o nízké hodnotě pH, pufru D o hodnotě pH 5,9 (D1-D6) a pufru E o hodnotě pH 4,5 (E1-E6). Pro výrobu protilátky byly použity nejčistější a zároveň na protein GL50803_16424 nejbohatší frakce D1 až D3.

5.3.2 Testování protilátek anti-GL50803_16424

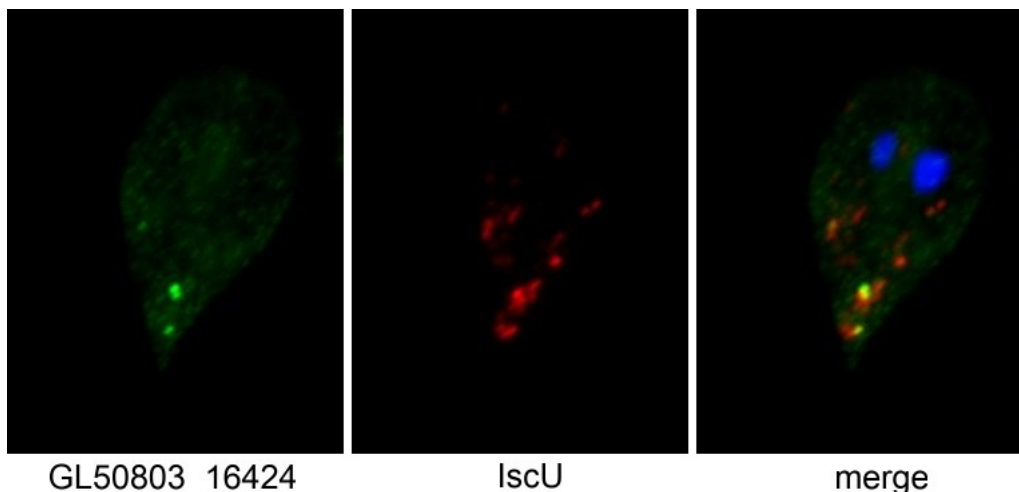
Z předchozích kroků získané polyklonální protilátky byly testovány metodou western blot na buněčných frakcích *G. intestinalis* kmene WB (lyzát, cytosolická frakce a „high speed pelet“) (Obr. 15). Dále byla protilátka získaná z potkana použita pro imunofluorescenční značení trofozoitů *G. intestinalis* kmene WB (Obr. 16). Protilátka získaná z králíka byla použita pro imunofluorescenční značení trofozoitů *G. intestinalis* exprimující hemagglutininovým (HA) tagem značený protein IscU (Obr. 17), a to z toho důvodu, aby bylo možné ve stejném preparátu vizualizovat mitosomy (Dolezal et al., 2005). Z těchto ověření bylo patrné, že protilátka získaná z potkana byla specifitější a byla proto použita pro další pokusy.



Obr. 15: Polyklonální protilátky proti proteinu GL50803_16424 z potkana (A) a králíka (B) ověřené metodou western blot na frakcích trofozoitů *G. intestinalis* kmene WB (LYZ-lyzát; CYT-cytosolický frakce; HSP). V případě králičí protilátky jsou patrné proužky neodpovídající proteinu GL50803_16424, ten je přítomen převážně ve frakci HSP (šipka). V případě protilátky z potkana se jedná o protilátku s větší specifitou.



Obr. 16: Lokalizace proteinu GL50803_16424 značeného protilátkou získanou z potkana (zeleně); mitosomy značené protilátkou proti GL50803_9296 (červeně); jádra značena DAPI (modře). Je patrná blízká lokalizace proteinu GL50803_16424 a mitosomů.



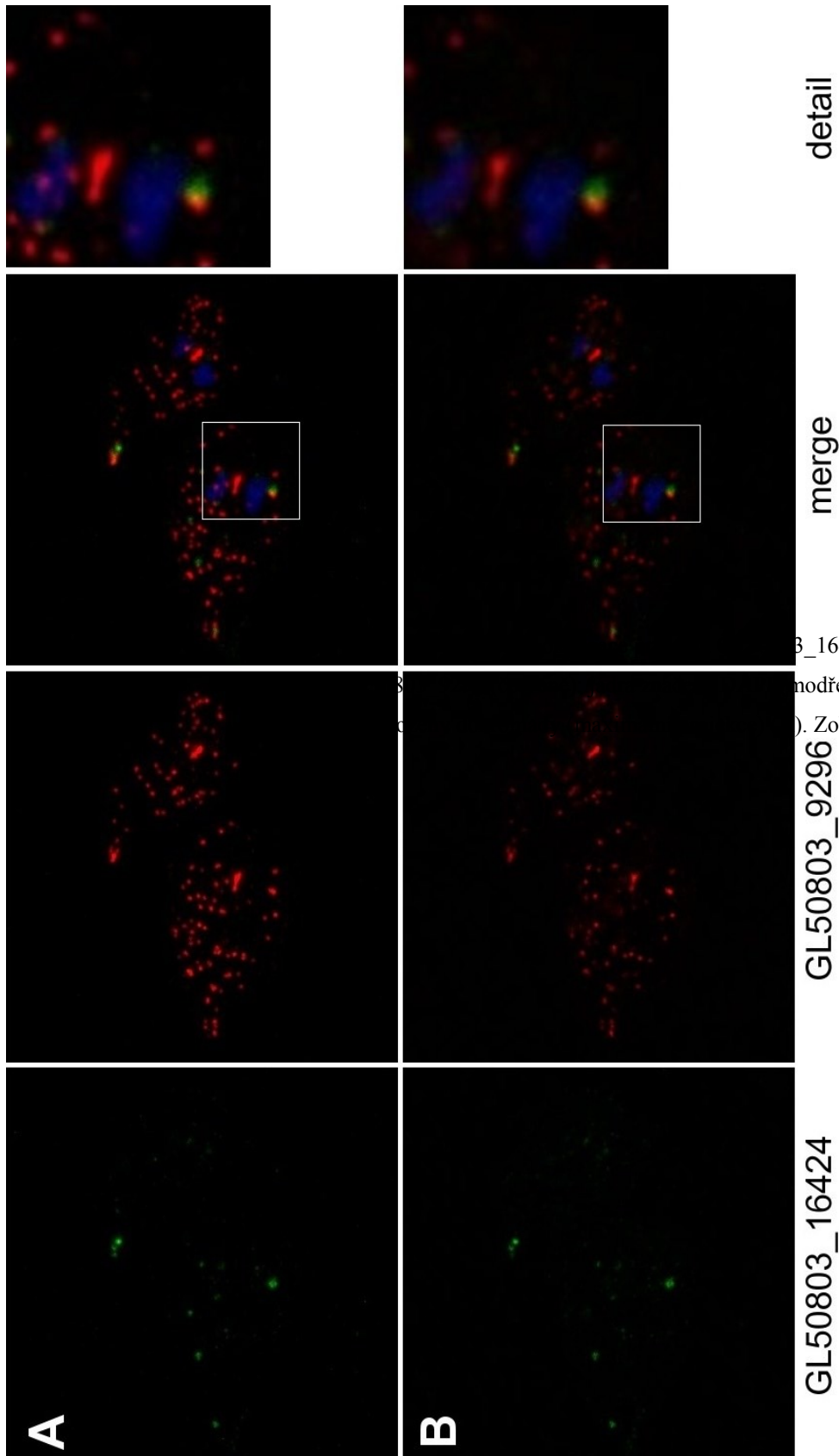
Obr. 17: Lokalizace proteinu GL50803_16424 značeného protilátkou získanou z králíka (zeleně); mitosomy značené protilátkou proti HA tagu připojeného k mitosomálnímu proteinu IscU (červeně); jádra značena DAPI (modře). Opět je patrná blízká lokalizace proteinu GL50803_16424 a mitosomů, nicméně v těchto preparátech měla králičí protilátka zvýšený signál v pozadí.

5.3.3 Určení lokalizace proteinu GL50803_16424 konfokální mikroskopií

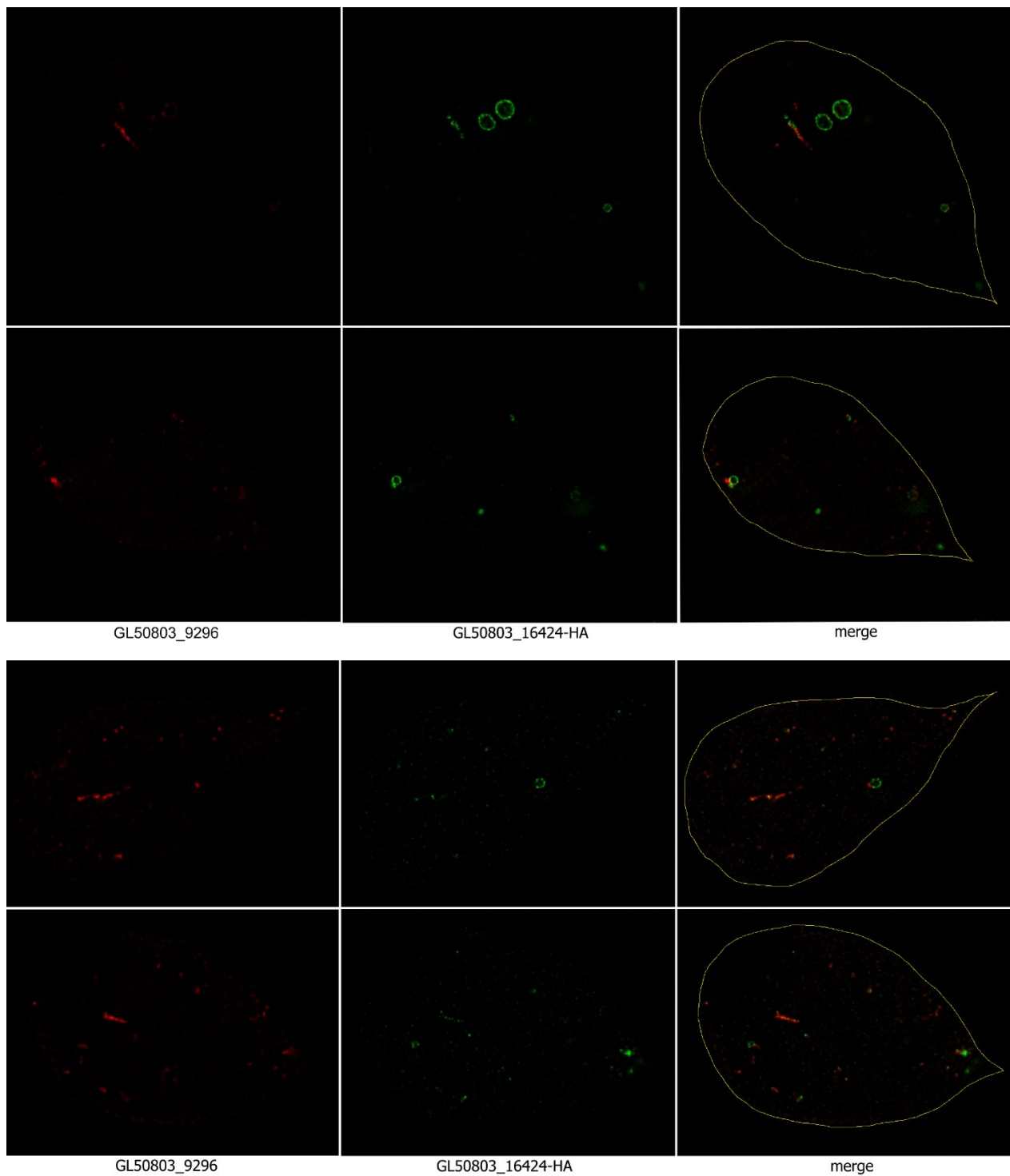
Pro upřesnění lokalizace proteinu GL50803_16424 v buňkách trofozoitů kmene *G. intestinalis* kmene WB (divoký kmen) byly vytvořeny preparáty těchto buněk s použitím námi vytvořené potkaní protilátky proti proteinu GL50803_16424 a protilátky proti proteinu GL50803_9296, která specificky značí mitosomy. Pro určení lokalizace proteinu GL50803_16424 a jeho případné kolokalizaci s mitosomy byla pro snímání použita metoda Z-stack, tedy snímání několika vrstev buňky nad sebou (Obr. 18).

5.3.4 Určení lokalizace proteinu GL50803_16424 mikroskopií STED

Pro lepší rozlišení a přesnější určení možné kolokalizace mitosomů a proteinu GL50803_16424 byla zvolena metoda superrezoluční mikroskopie STED (z angl. stimulated emission depletion) – vyčerpání stimulovanou emisí. Pro tento pokus byl připraven preparát s buňkami trofozoitů *G. intestinalis* kmene exprimující protein GL50803_16424 s připojeným hemagglutininovým (HA) tagem (Martincová et al., 2015). Jako primární protilátka byla použita anti-HA pro značení proteinu GL50803_16424 a protilátka proti GL50803_9296 pro značení mitosomů. Protilátka proti GL50803_16424 nemohla být použita, protože se jedná o protilátku polyklonální, která nebyla dostatečně specifická pro tuto mikroskopickou metodu (viz kapitola 5.3.2). Výsledný obrazový materiál byl upraven programem pro dekonvoluci Huygens Professional (Obr. 19).



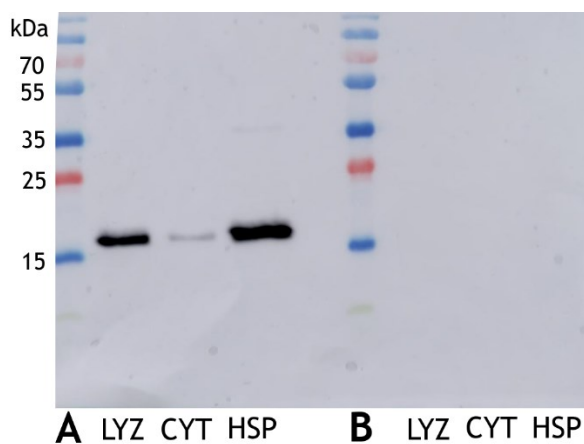
GL50803_16424 značeného protilátkou získanou z králíka (modře). Konfokální mikroskopii byly získány snímky (A) a (B). Zobrazení jednoho snímku Z-stack (B). Na přelomu a proteinu GL50803_16424.



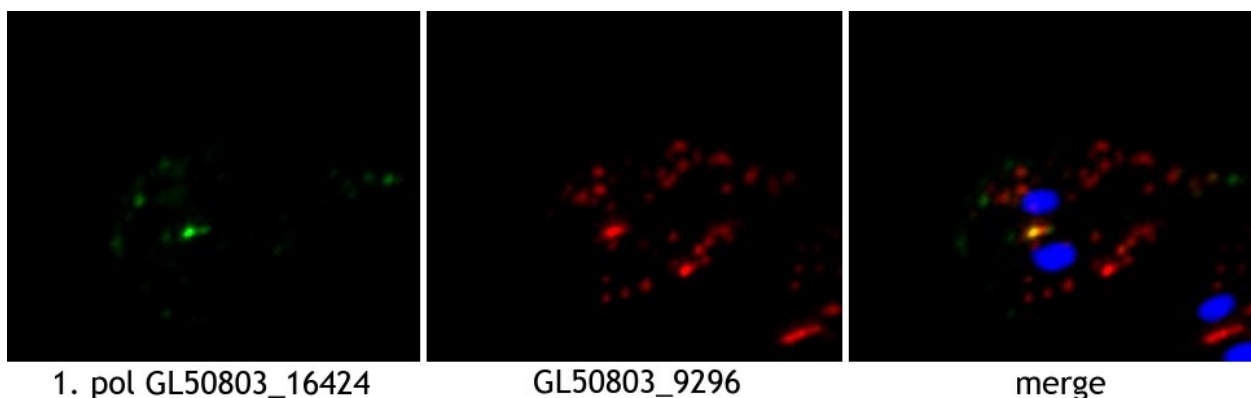
Obr. 19: Lokalizace proteinu GL50803_16424-HA značeného protilátkou anti-HA (zeleně); mitosomy značené protilátkou proti GL50803_9296 (červeně). Díky vyššímu rozlišení a provedené dekonvoluci jsou patrné „průřezy“ sférickými strukturami tvořené proteinem GL50803_16424. Na překryvu signálů je viditelná lokalizace proteinu GL50803_16424 vedle mitosomu. Obrys buněk trofozoitů je vyznačen žlutým obrysem.

5.3.5 Určení lokalizace 1. a 2. poloviny proteinu GL50803_16424

Ačkoli protein GL50803_16424 nemá predikovanou N-koncovou signální sekvenci do mitochondrie/mitosomu, byl navrhnut experiment k otestování lokalizace na dvě poloviny rozděleného proteinu GL50803_16424. DNA sekvence proteinu GL50803_16424 byla rozdělena na 378 a 381 nukleotidů dlouhé sekvence, odpovídající první a druhé polovině proteinu. Tyto sekvence byly amplifikovány pomocí PCR metody. Amplifikovaná DNA byla vložena do plazmidového vektoru pTG-IscU-DHFR-C-HAHA, nesoucí dvojité HA tag, skrze restrikční místa *NdeI* a *PstI* (v případě 1.pol. GL50803_16424) a *AseI* a *SbfI* (v případě 2.pol. GL50803_16424). Správnost sekvencí obou upravených plazmidů byla potvrzena jejich osekvenováním. Expres 1. a 2. poloviny GL50803_16424 byla ověřena metodou western blot použitím protilátky anti-HA na frakcích získaných z kultur trofozoitů obou transfekovaných linií (Obr. 20). Ačkoli sekvence obou konstruktů byly správné, exprimován byl pouze protein odpovídající 1. polovině proteinu GL50803_16424 značený dvojitým HA tagem. Buňky trofozoitů této transfekované linie *G. intestinalis* byly poté použity pro tvorbu preparátu, 1. polovina proteinu GL50803_16424 byla fluorescenčně značena a pozorována její lokalizace (Obr. 21). Tento konstrukt měl lokalizaci podobnou lokalizaci celého proteinu, lze se tedy domnívat, že N-koncová část je zodpovědná za transport GL50803_16424 k mitosomům.



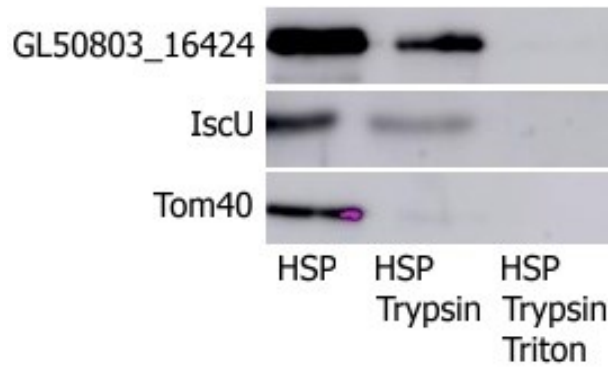
Obr. 20: Western blot zobrazující expresi proteinu 1. pol. GL50803_16424 (A), protein je podle očekávání přítomen převážně v HSP frakci a v lyzátu (LYZ). 2. pol. GL50803_16424 nebyla detekována v žádné frakci.



Obr 21: Lokalizace proteinu 1. poloviny GL50803_16424 značeného protilátkou anti-HA (zeleně); mitosomy značené protilátkou proti GL50803_9296 (červeně); jádra značena DAPI (modře). Je patrná blízká lokalizace proteinu GL50803_16424 a centrálních mitosomů v oblasti mezi jádry.

5.4 Zkouška proteázou trypsinem

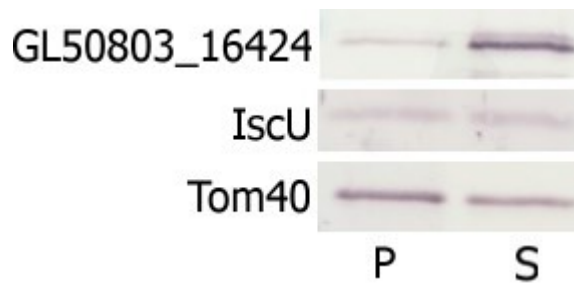
Pro ověření, zda protein GL50803_16424 lokalizuje do membránou chráněné buněčné struktury byla provedena zkouška proteázou trypsinem. Pro tento pokus byla použita HSP frakce z buněk trofozoitů *G. intestinalis* exprimující HA tagem značený protein GL50803_16424 (Martincová et al., 2015). Proteiny *GiTom40* a *GiIscU* byly použity jako indikátory pro tuto zkoušku. *GiTom40* je protein lokalizovaný ve vnější mitosomální membráně a je vystaven exogenně přidané proteáze trypsinu použité v této zkoušce. Protein *GiIscU* je naopak skryt před účinky proteázy v matrix mitosomu. Pro potvrzení, že ochrana před proteázou je zajištěna lipidovou dvouvrstvou, byl jako kontrola ke vzorku přidán detergent Triton X-100. Výsledek zkoušky byl vyobrazen metodou western blot (Obr. 22). Ve vzorku s exogenně přidaným trypsinem došlo ke štěpení proteinu *GiTom40*, zatímco množství proteinu GL50803_16424 se snížilo nepatrně. Množství proteinu *GiIscU* bylo také sníženo, nicméně protein nevyšel. Z toho vyplývá, že množství přidaného trypsinu bylo nadměrné a došlo tak k proteolytickému štěpení všech zkoumaných proteinů. Byla snaha experiment optimalizovat změnou množství přidávaného trypsinu, nedošlo však ke zlepšení výsledků. I přes tento neúspěch lze soudit, že protein GL50803_16424 má pravděpodobně stejný charakter jako protein *GiIscU*, a bude chráněn před účinkem proteázy membránovou strukturou.



Obr. 22: Western blot zobrazující pokles množství proteinů ve frakci po exogenním přidání proteázy trypsinu. Protein *GiTom40* nebyl detekovatelný po přidání trypsinu, zatímco protein *GiIscU* a GL50803_16424 byl ve vzorku v určitém množství přítomen. Kontrolní vzorek s přidáním detergentem Tritonem vyšel podle očekávání negativní.

5.5 Zkouška uhličitanelem sodným

Pro určení, zda by protein GL50803_16424 mohl být membránovým proteinem byla zvolena extrakce uhličitanelem sodným. Tato zkouška se používá pro oddělení integrálních membránových proteinů od proteinů periferních, s membránou asociovaných nebo solubilních. Proteiny *GiTom40* a *GiIscU* byly opět použity jako indikátory pro tuto zkoušku. Protein *GiTom40* je lokalizován ve vnější mitosomální membráně a bylo ověřeno, že po rozrušení membrán uhličitanelem sodným zůstává asociován s membránou a lze ho detekovat pouze v peletu (Dagley et al., 2009). Druhý protein *GiIscU* je lokalizován v matrix mitosomu a po rozrušení membrán uhličitanelem sodným dochází k jeho uvolnění do fáze supernatantu. Pro tento pokus byla použita HSP frakce z buněk trofozoitů *G. intestinalis* exprimující HA tagovaný protein GL50803_16424. Výsledek zkoušky byl vyobrazen metodou western blot (Obr. 23). Navzdory očekávání byl protein *GiTom40* přítomen i v supernatantu. Tento výsledek naznačuje, že došlo během této metody k nadměrnému rozrušení membrán mitosomů a následnému uvolnění *GiTom40* do supernatantu. Byla snaha experiment optimalizovat změnou doby působení uhličitanelem sodným, nedošlo však ke zlepšení výsledku. I přes tento neúspěch lze, dle výrazného množství proteinu GL50803_16424 v supernatantu oproti množství tohoto proteinu v peletu, předpokládat, že protein GL50803_16424 bude pravděpodobně solubilní.



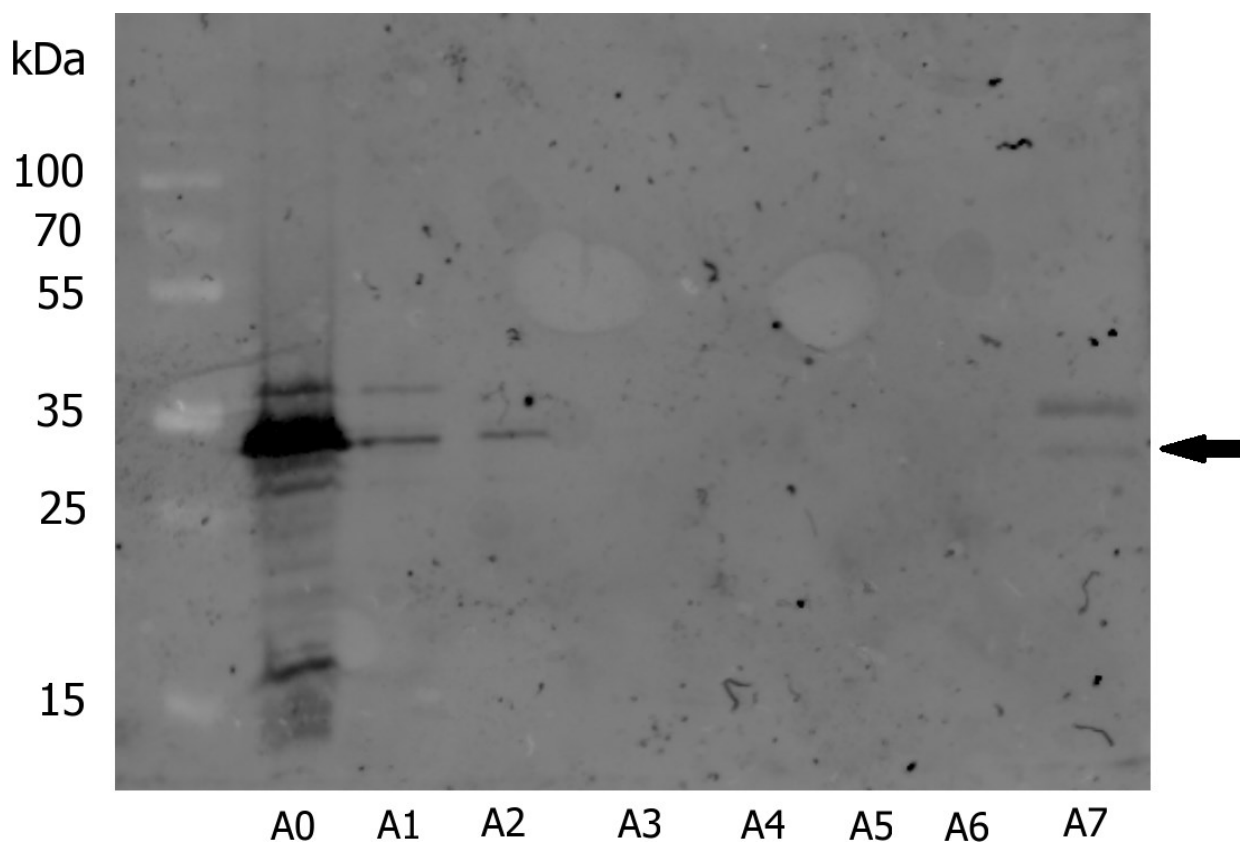
Obr. 23: Western blot zobrazující výsledek extrakce uhličitánem sodným. Proužky odpovídající velikosti jednotlivých proteinů GL50803_16424, *GiIscU* a *GiTom40* přítomné v peletu a supernatantu vzorku po extrakci uhličitánem sodným. Je viditelné větší množství proteinu GL50803_16424 v supernatantu, nicméně přítomnost proteinu *GiTom40* ve stejné frakci naznačuje nežádoucí nadměrné působení uhličitánu sodného na membrány.

5.6 Určení potenciálních interakčních partnerů GL50803_16424

5.6.1 Experiment crosslikování proteinu GL50803_16424

Narostlé buněčné kultury trofozoitů *G. intestinalis* exprimující protein GL50803_16424-BAP/BirA a buněčné kultury trofozoitů *G. intestinalis* exprimující pouze protein pro enzym BirA byly lyzovány a centrifugovány. Získané frakce HSP obohacené na mitosomy byly inkubovány s 50 μ M DSP (dithiobis (succinimidyl propionát), jejíž funkční skupiny NHS (N-hydroxysukcinimid) estery tvoří chemické vazby s primárními aminy proteinů. Těto vlastnosti je využíváno pro studium protein-protein interakcí a proces se označuje jako crosslink proteinů. DSP je navíc membránově permeabilní a je tak schopný crosslinkovat proteiny i uvnitř membránových struktur. K ukončení reakce dochází po přidání pufru Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethanu), který také obsahuje primární aminy a vyvazuje DSP. Následně byl crosslinkovaný protein GL50803_16424-BAP izolován pomocí magnetických kuliček Dynabeads konjugovaných se streptavidinem. Přítomnost/nepřítomnost proteinu GL50803_16424-BAP v kontrolních vzorcích odebíraných během crosslink experimentu (A0-A7; viz kapitola 4.2.8) byla ověřena na SDS-PAGE elektroforéze a western blotu (Obr. 24). Navzdory očekávání byl protein přítomen v určitém množství v peletu po druhé centrifugaci (A1), naznačující množství proteinu, který se necrosslinkoval. Pro další postup experimentu byl použit supernatant získaný po druhé centrifugaci (A2), kde byl protein dostatečně přítomen. Naopak protein GL50803_16424 nebyl detekován v naředěném supernatantu (A3), získaném po druhé centrifugaci (A2), a ve vzorku před prvním promytím magnetických kuliček (A4), zřejmě důsledkem velkého naředění vzorku. Během promývacích fází (A5 a A6), kdy se odstraňují necrosslinkované

proteiny nedošlo ke ztrátě crosslinkovaného proteinu GL50803_16424-BAP. Ve konečném vzorku bylo přítomné dostatečné množství proteinu použitelné pro následnou analýzu hmotnostní spektrometrií (A7). Ověření proteinu GL50803_16424-BAP v kontrolách posloužilo k optimalizaci jednotlivých kroků při opakování tohoto pokusu. Celkem byl tento pokus opakován třikrát. Stejný postup crosslink experimentu byl aplikován i na HSP frakci z buněčné kultury trofozoitů *G. intestinalis* exprimující pouze protein pro enzym BirA, která sloužila jako kontrola pro porovnání crosslinkovaných proteinů.



Obr. 24: Na western blotu zobrazená přítomnost proteinu GL50803_16424-BAP ve vstupní vzorku - frakci HSP (A0), v peletu (A1) i v naředěném vzorku po inkubaci s DSP(A2) po druhé centrifugaci, ve finálním vzorku pro analýzu hmotnostní spektrometrií (A7) (označené šipkou); horní proužky představují protein GL50803_16424-BAP s enzymem biotin ligázou (BirA).

5.6.2 Analýza hmotnostní spektrometrií a výsledná data

Výsledkem analýzy hmotnostní spektrometrie (viz kapitola 4.2.9) byl soubor proteinů ze vzorku crosslinkovaného GL50803_16424-BAP (obsahující také BirA) a vzorku crosslinkované samotné BirA. Pokus byl opakován celkem třikrát. Výsledné tři sady dat z hmotnostní

spektrometrie byly sloučeny a upraveny do jednoho výsledného souboru. Tato data byla upravena podle hodnot intenzit přiřazené jednotlivým identifikovaným proteinům. Hodnota intenzity přiřazená výsledkům hmotnostní spektrometrie reflektovala množství konkrétních proteinů ve vzorcích. Proteiny byly poté rozděleny do čtyř kategorií: i) proteiny unikátní ve vzorku GL50803_16424-BAP; ii) proteiny nabohacené v GL50803_16424-BAP oproti BirA; iii) proteiny unikátní ve vzorku BirA; iv) proteiny nabohacené v BirA oproti GL50803_16424-BAP. Nejvíce nás zajímali proteiny nabohacené v GL50803_16424-BAP oproti BirA a proteiny unikátní ve vzorku GL50803_16424-BAP, mezi těmito proteiny se dá předpokládat zastoupení potenciálních interakčních partnerů proteinu GL50803_16424.

K identifikovaným proteinům byla přiřazena anotovaná funkce uvedená v databázi GiardiaDB. Některé proteiny přítomné v našich výsledcích byly již experimentálně zkoumány a byla určena jejich lokalizace v buňkách *G. intestinalis* (Obr. 21) (Hagen et al., 2011). Dále byly hledány proteinové rodiny/domény identifikovaných proteinů bioinformatickým nástrojem HHpred v databázi Pfam a jejich lokalizace nástrojem TargetP (viz kapitola 4.2.1).

Kategorie nabohacených proteinů ve vzorku GL50803_16424-BAP oproti BirA obsahovala proteiny přítomné, jak ve vzorku crosslinkovaného proteinu GL50803_16424, tak v kontrole a tyto výsledky mají vyšší vypovídací hodnotou. Podle parametru intenzity bylo z této kategorie vybráno prvních patnáct proteinů jejichž vlastnosti byly dále bioinformaticky zkoumány (Tabulka 11). Na prvním místě je zastoupen zkoumaný protein GL50803_16424, jehož pozice v našem žebříčku potvrzuje správnost předcházejícího pokusu. Mezi dalšími proteiny, které byly určeny jako interakční partneři proteinu GL50803_16424, byl chaperon Hsp70, proteiny endoplazmatického retikula (Bip – také protein z rodiny „heat shock proteinů 70“, protein disulfid izomerázy), proteiny jejichž lokalizace byla navržena jako mitosomální, avšak bez známé funkce (GL50803_17342, GL50803_14802), povrchové proteiny VSP (z angl. variant-specific surface protein) a proteiny označované jako alfa-giardiny, homology annexinů, proteinů asociovaných s plazmatickou membránou. Cytoskeletární proteiny alfa-giardiny jsou v *G. intestinalis* vysoce exprimované, z toho důvodu může přítomnost těchto proteinů ve vzorku znamenat kontaminaci (Weiland et al., 2005).

Kategorie unikátních proteinů ve vzorku GL50803_16424-BAP obsahovala proteiny přítomné pouze ve vzorku crosslinkovaného proteinu GL50803_16424. Podle parametru intenzity

bylo z této kategorie vybráno prvních patnáct proteinů s nejvyšší intenzitou (Tabulka 12), které byly dále zkoumány jako možné interakční partnery. I mezi těmito proteiny byly přítomny VSP, protein disulfid izomeráza a další proteiny s neznámou funkcí. U jednoho z nich byla predikována lokalizace do mitosomu (GL50803_17352).

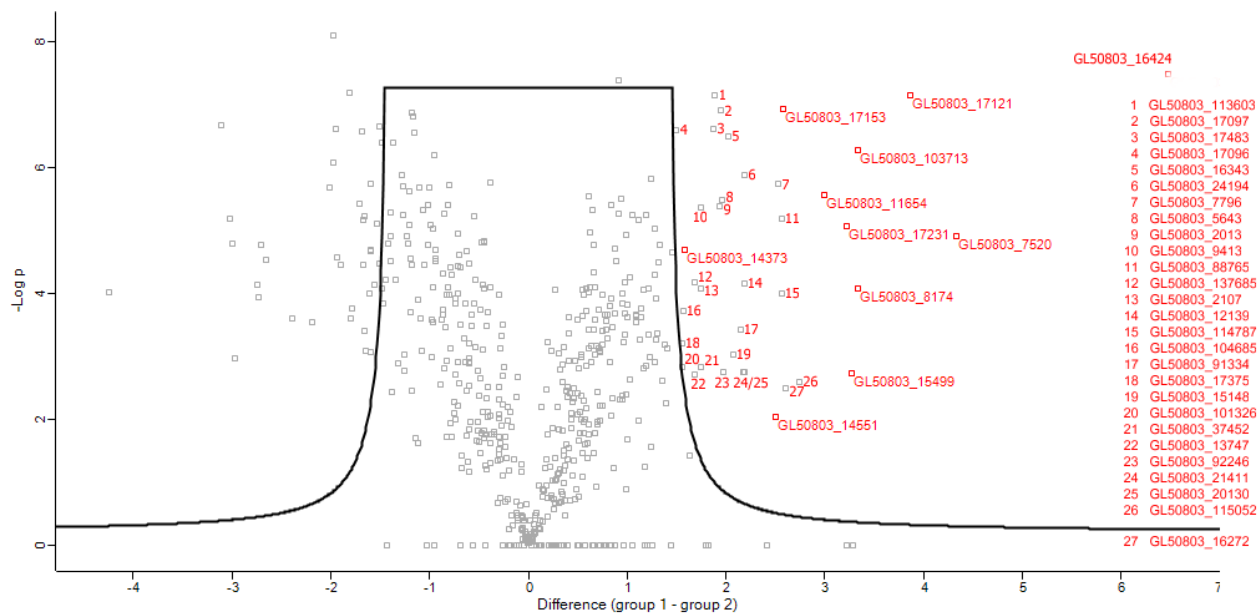
Po statistických úpravách byl v programu Perseus (verze 1.6.0.7) vytvořen volcano plot zobrazující signifikantní (statisticky významné) výsledky (Obr. 25). Z těchto výsledků bylo opět vybráno prvních patnáct proteinů jako možných interakčních partnerů GL50803_16424 (Tabulka 13). Mezi těmito výsledky lze opět najít proteiny endoplazmatického retikula Bip a protein disulfid izomerázu. Dále jsou mezi statisticky významnými proteiny již zmiňované alfa-giardiny a nově (v porovnání s proteiny v tabulce 11 a 12) byly jako signifikantní určeny dva proteiny patřící do rodiny NEK kináz. NEK kinázy jsou v organismu *G. intestinalis* hojně zastoupené (198 NEK kináz u *G. intestinalis* oproti 11 NEK kináz u člověka) a většina z nich obsahuje motiv ankyrinových repetic, umožňující protein-proteinové interakce (Manning et al., 2011; Mosavi et al., 2004). Spojení ankyrinových opakování s NEK kinázami je pro *G. intestinalis* specifické a nebylo pozorováno u jiných druhů (Manning et al., 2011). Dle dat Manninga a kol. byla v našich datech přítomná NEK kináza GL50803_17231 predikovaná jako neaktivní enzym (chybí katalytické K72 a D166 AK zbytky) s 12 ankyrinovými repeticemi; druhá NEK kináza GL50803_16272 byla také určena jako neaktivní (chybí katalytický D166 AK zbytek) s 13 ankyrinovými repeticemi (Manning et al., 2011). Ankyrinové repetice obsahují i další nalezené proteiny. Jeden z nich signifikantní protein GL50803_8174 patří do málo známé proteinové rodiny proteinů 21.1 (Manning et al., 2011). Lokalizace NEK kináz a dvou dalších proteinů s predikovanou mitosomální lokalizací byla již experimentálně zkoumána v práci Hagen a kol. (Obr. 26), kde tyto proteiny fúzované s GFP lokalizovaly do oblasti disku (Hagen et al., 2011).

ID proteinu	Anotace v GiardiaDB	TargetP lokalizace	HHpred predikce	HHpred E-value
GL50803_16424	Protein neznámé funkce	0,86 J	Mlf1IP; myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein	2,8e-29
GL50803_17121	Bip	0,74 S	HSP70; Hsp 70 protein	2,1e-63
GL50803_103713	Protein disulfide isomerase PDI4	0,94 S	Calsequestrin; Calsequestrin	1,9e-30
GL50803_14551	Alpha-6 giardin	0,91 J	Annexin; Annexin	2,4e-9
GL50803_40571	VSP (Variant-specific surface protein)	0,93 J	VSP; Giardia variant-specific surface protein	7,7e-17
GL50803_7796	Alpha-2 giardin	0,91 J	Annexin; Annexin	2e-9
GL50803_17520	ClpB protein	0,86 J	AAA_32; AAA domain	9,5e-12
GL50803_15247	Grp94/Hsp90	0,79 S	HSP90; Hsp90 protein	1,2e-87
GL50803_8064	Protein disulfide isomerase PDI5	0,62 S	Thioredoxin; Thioredoxin	7,9e-16
GL50803_14802	hemagglutinin protein-like protein	0,61 M	CNP1; CNP1-like family	160
GL50803_92645	5' nucleotidase family protein	0,97 S	5_nucleotid_C; 5'-nucleotidase, C-terminal domain	1,3e-20
GL50803_114210	Protein neznámé funkce	0,81 S	Peptidase_M26_N; M26 IgA1-specific metallo-endopeptidase N-terminal region	1,9e-7
GL50803_17342	Protein neznámé funkce	0,48 M	MFS_3; Transmembrane secretion effector	1,5e-27
GL50803_17432	Heat shock protein 70	0,95 S	HSP70; Hsp70 protein	8,1e-38
GL50803_17000	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	0,88 S	Pro_isomerase; Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD	6,7e-34

Tabulka 11: Seznam a vlastnosti prvních 15 proteinů nejvíce nabohacených ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424-BAP oproti kontrole BirA. Barevně vyznačená lokalizace určená nástrojem TargetP: S-sekretorická dráha; M-mitochondriální; J-jiná lokalizace. Některé proteiny mají experimentálně určenou lokalizaci (tučně vyznačené).

ID proteinu	Anotace	TargetP lokalizace	HHpred predikce	HHpred E-value
GL50803_114277	VSP (Variant-specific surface protein)	0,55 J	VSP; Giardia variant-specific surface protein	3,2e-18
GL50803_29490	Copine I	0,91 J	Copine; Copine	3,5e-15
GL50803_3062	Protein neznámé funkce	0,86 S	MIG-14_Wnt-bd; Wnt-binding factor	3,4
GL50803_11599	Lysophosphatidic acid phosphatase	0,74 S	His_Phos_2; Histidine phosphatase superfamily	3,1e-38
GL50803_4181	Protein neznámé funkce	0,99 S	TauE; Sulfite exporter TauE/SafE	4,2e-20
GL50803_15125	Protein neznámé funkce	0,49 J	CS; CS domain	0,47
GL50803_14670	Protein disulfide isomerase PDI3	0,84 S	Thioredoxin; Thioredoxin	9,3e-18
GL50803_16827	Protein neznámé funkce	0,86 J	Sas10_Utp3; Sas10/Utp3/C1D family	2,4e-14
GL50803_27717	High cysteine membrane protein Group 3	0,96 S	VSP; Giardia variant-specific surface protein	1,4e-18
GL50803_16888	Protein neznámé funkce	0,99 S	Prominin; Prominin	0,000048
GL50803_5768	Protein neznámé funkce	0,92 J	Popeye; Popeye protein conserved region	4e-9
GL50803_10016	Protein neznámé funkce	0,94 S	Calsequestrin; Calsequestrin	2,8e-18
GL50803_23888	FixW protein, putative	0,62 S	YtfJ_HI0045; Bacterial protein of unknown function	4,5e-15
GL50803_101955	Protein neznámé funkce	0,58 S	DUF2370; Protein of unknown function	18
GL50803_17352	Protein neznámé funkce	0,50 M	ABA_GPCR; Abscisic acid G-protein coupled receptor	210

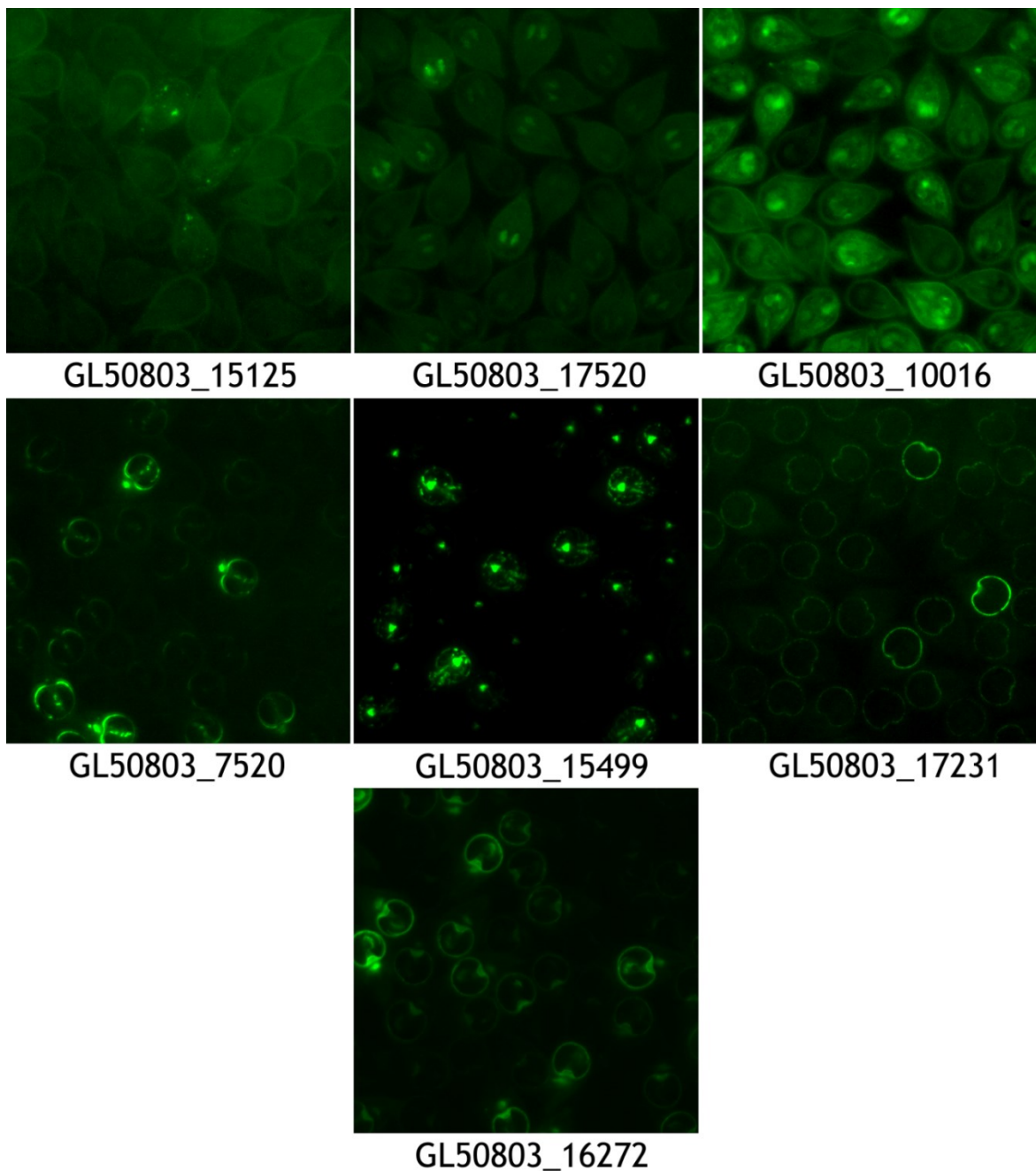
Tabulka 12: Seznam a vlastnosti prvních 15 proteinů unikátních ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424-BAP a nepřítomných v kontrole BirA. Barevně vyznačená lokalizace určená nástrojem TargetP: S-sekretorická dráha; M-mitochondriální; J-jiná lokalizace. Některé proteiny mají experimentálně určenou lokalizaci (tučně vyznačené).



Obr 25: Volcano plot zobrazující data z analýz hmotnostní spektrometrie. Statisticky významné výsledky jsou zobrazeny červeně v pravé části grafu nad hranicí t-testu. Jedná se o proteiny nabohacené ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424-BAP oproti kontrole. Osa x vyjadřuje rozdíl hodnot intenzit v obou analyzovaných vzorcích; osa y vyjadřuje záporný logaritmus hodnoty p. Vytvořeno v programu Perseus (verze 1.6.0.7), při hodnotě FDR=0,005 („false discovery rate“).

ID proteinu	Anotace	TargetP lokalizace	HHpred predikce	HHpred E-value
GL50803_16424	Protein neznámé funkce	0,86 J	Mlf1IP; myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein	2,8e-29
GL50803_7520	Protein neznámé funkce	0,73 M	CALCOCO1; Calcium binding and coiled-coil domain (CALCOCO1) like	0,012
GL50803_17121	Bip	0,74 S	HSP70; Hsp 70 protein	2,1e-63
GL50803_8174	Protein 21.1	0,69 J	DUF249; Multigene family 530 protein	1,3e-16
GL50803_103713	Protein disulfide isomerase PDI4	0,94 S	Calsequestrin; Calsequestrin	1,9e-30
GL50803_15499	Protein neznámé funkce	0,89 M	CALCOCO1; Calcium binding and coiled-coil domain (CALCOCO1) like	0,0019
GL50803_17231	Kinase, NEK	0,61 J	Pkinase; Protein kinase domain	1,3e-31
GL50803_11654	Alpha-1 giardin	0,94 J	Annexin; Annexin	2,7e-9
GL50803_115052	Multidrug resistance-associated protein 1	0,88 J	ABC_ATPase; Predicted ATPase of the ABC class	1,3e-19
GL50803_16272	Kinase, NEK	0,79 J	Pkinase; Protein kinase domain	1,2e-34
GL50803_17153	Alpha-11 giardin	0,93 J	Annexin; Annexin	1e-9
GL50803_88765	Cytosolic Hsp70	0,85 J	HSP70; Hsp70 protein	5,6e-65
GL50803_114787	Alpha-7.3 giardin	0,93 J	Annexin; Annexin	2,2e-9
GL50803_7796	Alpha-2 giardin	0,91 J	Annexin; Annexin	2e-9
GL50803_14551	Alpha-6 giardin	0,91 J	Annexin; Annexin	2,4e-9

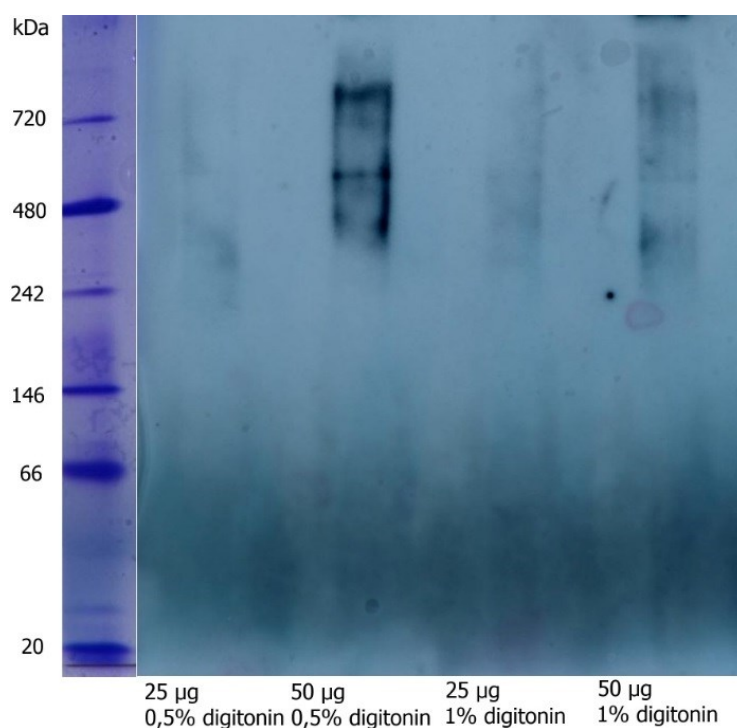
Tabulka 13: Seznam a vlastnosti prvních 15 signifikantních proteinů nabohacených ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424-BAP oproti kontrole BirA. Barevně vyznačená lokalizace určená nástrojem TargetP: **S-sekretorická dráha**; **M-mitochondriální**; **J-jiná lokalizace**. Některé proteiny mají experimentálně určenou lokalizaci (tučně vyznačené).



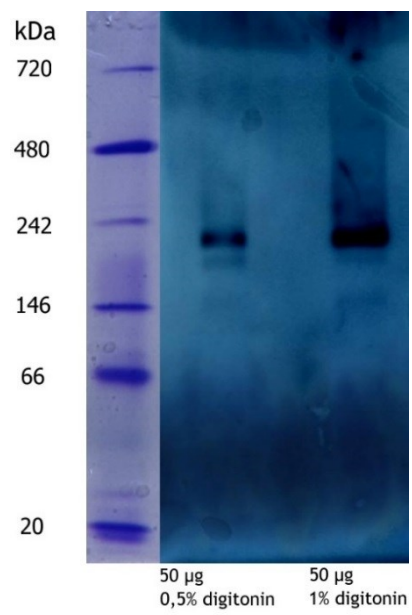
Obr. 26: Lokalizace některých proteinů vyskytujících se ve výsledcích z analýzy hmotnostní spektrometrie crosslinkovaného GL50803_16424. Tyto proteiny byly fúzovány s GFP a studovány v práci Hagen a kol. Protein GL50803_17520 lokalizuje do jader; GL50803_7520 lokalizuje na okraj disku, bazálních tělísek a do mediálního tělíska; GL50803_15499 lokalizuje do bazálních tělísek, laterálního hřbetu a axonem; GL50803_17231 lokalizuje do ventrálního disku a laterálního hřbetu; GL50803_16272 lokalizuje na okraj disku. Převzato z Hagen et al., 2011.

5.7 Modrá nativní elektroforéza GL50803_16424

Pro ověření, zda protein GL50803_16424 tvoří proteinové komplexy byly čtyři vzorky HSP frakce trofozoitů *G. intestinalis* kmene exprimujících protein GL50803_16424 značený HA tagem s různým množstvím proteinů (25 μ g a 50 μ g) a různou koncentrací digitoninu (0,5% a 1%) testovány na přítomnost proteinových komplexů asociovaných s proteinem GL50803_16424. Přidaný digitonin způsobí solubilizaci proteinových komplexů, jejich separace byla provedena metodou modré nativní SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy (Obr. 27). Vzhledem k výsledkům práce Martinové a kol., které naznačovaly možnou interakci proteinu GL50803_16424 a proteinu *GiTom40* byl vzorek HSP frakce trofozoitů *G. intestinalis* kmene exprimujících protein GL50803_16424 značený hemaglutininovým (HA) tagem s množstvím proteinů 50 μ g a různou koncentrací digitoninu (0,5% a 1%) testován na přítomnost proteinových komplexů s *GiTom40* (Obr. 28) (Martinová et al., 2015). Tvorba společného komplexu proteinu GL50803_16424 a *GiTom40* se nepotvrdila. Protein GL50803_16424 tvořil proteinové komplexy o velikostech přibližně 550 kDa a 800 kDa, zatímco *GiTom40* tvoří proteinový komplex o velikosti 210 kDa.



Obr. 27: Western blot zobrazující výsledek modré nativní elektroforézy. Proteinové komplexy s proteinem GL50803_16424 byl detekovány protilátkou proti HA tagu, ve velikostech přibližně 550 kDa a 800 kDa. Zároveň byla zjištěna optimální koncentrace digitoninu (0,5%) a množství proteinů pro tuto metodu (50 μ g).



Obr. 28: Western blot zobrazující výsledek modré nativní elektroforézy. Proteinový komplex s proteinem *GiTom40* byl detekován protilátkou proti *GiTom40* ve velikosti přibližně 210 kDa. Zkouška byla provedena na vzorek s 50 µg proteinů a koncentrací digitoninu 0,5 % a 1 %.

6 Diskuze

Na rozdíl od mitochondrií jsou mitosomy velmi redukované a jejich biologická funkce je u organismu *G. intestinalis* omezená pouze na esenciální dráhu tvorby železo-sirných klastrů (Tovar et al., 2003). I přes získání některých znalostí o mitosomu (dynamika mitosomu, přítomnost ISC dráhy, podobnost mitosomálního transportu s mitochondriálním), je tato minimalistická organela předmětem intenzivního vědeckého zkoumání (Dolezal et al., 2005; Tovar et al., 2003; Voleman et al., 2017). Vzhledem k celkové evoluční divergenci *G. intestinalis* je pro identifikaci nových mitosomálních proteinů obtížně využívat metody srovnávací genomiky. Malá velikost mitosomů je navíc příčinou obtížné izolace organel, které jsou tak často kontaminovány dominantními buněčnými organelami jako např. endoplasmatickým retikulem. Pro identifikaci mitosomálních proteinů jsou tak proto převážně využívány nové experimentální metody a přímá ověřování lokalizace proteinů v buňkách (Jedelsky et al., 2011; Martinová et al., 2015; Rout et al., 2016). Během pár let se mitosomální proteom *G. intestinalis* rozšířil o další komponenty aparátu importu proteinů i o proteiny ISC dráhy (Dagley et al., 2009; Rada et al., 2009; Šmíd et al., 2008). Mnoho otázek ohledně této organely však zůstává nadále nezodpovězeno. Často diskutovaná je asociace mitosomu se sítí endoplazmatického retikula, které je v buňkách *G. intestinalis* hojně zastoupeno, nebo jakým způsobem dochází k exportu železo-sirných klastrů do cytosolu (Voleman et al., 2017). V nedávné době byla nově určena mitosomální lokalizace několika proteinů, mezi nimi i proteinu GL50803_16424 o neznámé funkci (Martinová et al., 2015). Náš zájem o tento protein vzbudily: i) rozpory v určení lokalizace (mitosom x ventrální disk) (Hagen et al., 2011; Martinová et al., 2015; Rout et al., 2016); ii) epizomální exprese GL50803_16424, která vedla k pozorování sférických struktur v místech mitosomů; iii) ko-precipitační experimenty naznačující interakci s proteiny vnější a vnitřní mitosomální membrány a s proteiny matrix mitosomu (Martinová et al., 2015).

6.1 Protein GL50803_16424

Před zahájením praktických experimentů s proteinem GL50803_16424 byla provedena jeho charakterizace *in silico*. Protein byl zařazen do doménové rodiny Mlf1IP („myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein“) a byl určen jako homolog lidského proteinu „myeloid leukemia factor 1“ (hMLF1); žádné další homology nebyly určeny. Fylogenetická distribuce proteinů této rodiny naznačuje komplikovanou evoluci těchto proteinů, neboť jsou přítomné jen u živočichů, rostlin a u některých linií prvoků. Rodina MLF („myeloid

leukemia factor“) zahrnuje málo charakterizované konzervované proteiny, jejíž nejvýznamnějším proteinem je MLF1. U člověka je přítomnost fúzního proteinu, který obsahuje MLF1 (hMLF1) a nukleofosmin (NPM), spojená s onemocněním myeloidoplastického syndromu a akutní myeloidní leukemie (AML). Asociace proteinové fúze s onemocněním tak stála za pojmenováním MLF1 proteinu (Yoneda-Kato et al., 1996). Protein hMLF1 se normálně vyskytuje v cytosolu, avšak fúzní forma proteinu s NPM lokalizuje do jádra (Yoneda-Kato et al., 1996). Bylo zjištěno, že protein hMLF1 má charakteristický vazebný motiv pro 14-3-3 protein, stejný vazebný motiv má i homologní protein identifikovaný u *Drosophila melanogaster* (dMLF) (Muslin et al., 1996; Ohno et al., 2000). Vazba 14-3-3 proteinu negativně reguluje proapoptické působení proteinu hMLF (Bras et al., 2012). Na rozdíl od proapoptického působení hMLF, má dMLF funkci koaktivátoru transkripčního faktoru udržující klidový a nediferencovaný stav progenitorových krevních buněk v larválním stádiu (Bras et al., 2012; Sun et al., 2015). Je zřejmé, že ani jedna z těchto funkcí nenaznačuje jakou roli má protein GL50803_16424 v *G. intestinalis*. Mezi daty získanými experimentem crosslinkování GL50803_16424 byl nalezen i protein anotovaný jako protein 14-3-3 (ID proteinu GL50803_6430), nicméně jeho skóre jako možného interakčního partnera bylo nízké.

Pomocí programu I-TASSER byl predikován model sekundární struktury a 3D model proteinu GL50803_16424 využívající identifikované proteinové struktury PDB ID: 5YFP v databázi PDB (Berman et al., 2000; Mei et al., 2018). Tato proteinová struktura identifikovaná v organismu *Saccharomyces cerevisiae* je strukturou exocystu, evolučně konzervovaného oktamerového proteinového komplexu umožňující vazbu post-Golgi sekretorických vezikulů k plazmatické membráně během exocytózy (Mei et al., 2018). 3D model proteinu GL50803_16424 vycházející z této proteinové struktury 5YFP byl nejlepším modelem z navržených I-TASSERem, nicméně skóre platnosti tohoto modelu bylo celkové nízké. Exocytózou jsou u *G. intestinalis* sekretovány převážně komponenty tvorby stěny cisty (Midlej et al., 2017). Naše data získaná crosslinkováním proteinu GL50803_16424 však nemohla ukázat možné zapojení proteinu GL50803_16424 se sekreční dráhou hlavních proteinů stěny cisty CWP (z angl. cyst wall protein: CWP1, CWP2, CWP3) (Ankarklev et al., 2010). Experiment crosslinkování GL50803_16424 byl proveden s buněčnou kulturou trofozoitů, kultivovanou v podmínkách, které expresi proteinů nutných pro encystaci neindukují. Navíc se zapojení proteinu GL50803_16424 do sekretorické dráhy dle dříve získaných dat nepředpokládalo (Martincová et al., 2015; Rout et al., 2016).

6.2 Lokalizace GL50803_16424

Rozdíly v určení lokalizace byl jedním z důvodů našeho zájmu o protein GL50803_16424. Hagen a kol. pozorovali lokalizaci fúzního proteinu GL50803_16424-GFP do oblasti ventrální disku, zatímco Martinová a kol. a Rout a kol. lokalizovali hemaglutininovým tagem (HA) značený protein GL50803_16424 do oblasti odpovídající mitosomům (Hagen et al., 2011; Martinová et al., 2015; Rout et al., 2016). Odlišná lokalizace proteinu GL50803_16424 s C-terminálně fúzovaným GFP mohla být způsobena právě výběrem GFP jako reportérového proteinu. V případě práce Martinové a kol. byly dokonce pozorovány nezvyklé sférické struktury podobné vezikulům (Martinová et al., 2015). S pomocí vytvořené specifické protilátky proti proteinu GL50803_16424 se nám podařilo lokalizovat tento protein v divokém kmeni *G. intestinalis* (WB). Naše pozorování potvrdila lokalizaci v blízkosti mitosomů. Pro přesnější určení lokalizace byla použita nejprve metoda konfokální mikroskopie a posléze i superrezoluční metoda STED. Získaný obrazový materiál, po provedení dekonvoluce, naznačil přítomnost proteinu GL50803_16424 v těsné blízkosti mitosomů, nikoli uvnitř mitosomů. Jako marker mitosomů byla pro přípravu veškerých preparátů použita protilátka proti proteinu GL50803_9296, jehož mitozomální lokalizace byla ověřena v dalších pracích (Martinová et al., 2015; Rout et al., 2016; Voleman et al., 2017). Neobvyklé sférické struktury byly v některých případech pozorovány v preparátech buněk trofozoitů kmene *G. intestinalis* epizomálně exprimujících GL50803_16424-HA a v buňkách exprimujících GL50803_16424-BAP. Přítomnost těchto struktur lze vysvětlit jako důsledek „overexprese“ proteinu v buňkách *G. intestinalis*. Jak v našich pokusech, tak v pokusech Martinové a kol. byl použit pro transfekci plazmid pONDRA se silným promotorem, který je součástí 5'-nepřekládané oblasti genu pro glutamát dehydrogenázu (GDH). Přítomnost těchto struktur nebyla pozorována v případech fluorescenčního značení buněk trofozoitů divokého kmene *G. intestinalis* (WB) námi vytvořenou protilátkou proti GL50803_16424. Protein odpovídající první polovině proteinu GL50803_16424 s C-terminálním dvojitým HA tagem byl pozorován v blízkosti centrálních mitosomů. Exprese druhé poloviny proteinu GL50803_16424 se nezdařila, přesto je pravděpodobné, že 1. polovina proteinu GL50803_16424 (jeho N-koncová část) by mohla být zodpovědná za kontakt s mitosomy. Bohužel z důvodu nedostatečně funkční protilátky, která by specificky značila struktury endoplazmatického retikula, nebylo možné fluorescenčně ověřit případnou kolokalizaci proteinu GL50803_16424 s touto organelou. Možnost lokalizace proteinu

GL50803_16424 s endoplazmatickým retikulem, hojně zastoupeným v *G. intestinalis*, se nabízela obzvláště po vyhodnocení výsledků z pokusu crosslinkování tohoto proteinu.

6.3 Vlastnosti proteinu GL50803_16424

Z výsledků zkoušek ochrany proteinu před proteázou trypsinem a ze zkoušky uhličitanem sodným je patrné, že protein GL50803_16424 vykazoval podobné výsledky jako protein *GiIscU*, který je chráněn před proteázou mitosomálními membránami a po jejich rozrušení s nimi asociován. Protein GL50803_16424 je zřejmě solubilní a je součástí membránou obalené struktury.

Pro další experimentální ověření možné interakce proteinu GL50803_16424 a proteinu *GiTom40*, naznačované v již zmíněných datech Martincové a kol. a Routa a kol., byla použita metoda zobrazující proteinové komplexy cílových proteinů – modrá nativní elektroforéza. Naše výsledky ukázaly tvorbu extrémně velkých proteinových komplexů (ve přibližných velikostech 550 kDa a 800 kDa) v případě proteinu GL50803_16424. Protein *GiTom40* tvořil proteinový komplex o velikosti přibližně 210 kDa. Stejnou velikost proteinového komplexu *GiTom40* určili i Dagley a kol. (Dagley et al., 2009). Možná interakce proteinu GL50803_16424 a *GiTom40* tak nebyla potvrzena.

6.4 Crosslink proteinu GL50803_16424 a jeho analýza

V rámci našeho zkoumání proteinu GL50803_16424 byl vytvořen konstrukt tohoto proteinu s připojeným biotin akceptorovým peptidem (BAP) na jeho C-konci. Díky expresi fúzního proteinu GL50803_16424-BAP v buňkách *G. intestinalis*, současně epizomálně exprimujících upravený enzym biotin ligázu (*BirA*), bylo možné protein po biotinylnaci *in vivo*, jednak fluorescenčně značit, tak i specificky izolovat. Toho bylo využito ve spojení s chemickým crosslinkováním proteinu GL50803_16424 molekulami DSP. Purifikovaný protein a s ním izolované možné interakční faktory byly následně analyzovány hmotnostní spektrometrií. Byla tedy použita stejná metoda, pomocí které Martincová a kol. určili nové mitosomální proteiny, včetně GL50803_16424 (Martincová et al., 2015). Navzdory tomu, že v práci Martincové a kol. protein GL50803_16424 koprecipitoval se všemi zkoumanými proteiny (*GiTom40*, *GiMOMP35*, *GiTim44*, *GiPam18*, *GiMtHsp70*), naše výsledky z tohoto pokusu nepřinesly žádný důkaz o tom, že by takto silná interakce platila i v opačném případě. Výsledky koprecipitace proteinu GL50803_16424 v práci Martincové a kol. s výše vypsány proteiny různých mitosomálních kompartmentů lze považovat za velmi přesvědčivé, protein GL50803_16424 měl ve všech případech vysoké skóre

z analýzy hmotnostní spektrometrií (Martincová et al., 2015). Naprosto neočekávaně bylo v našich výsledcích z analýzy hmotnostní spektrometrií zaznamenáno velmi nízké skóre s proteiny *GiTom40*, *GiTim44*, *GiMOMP35*, *GimtHsp70*. Z toho vyplývá, že ačkoli mitosomální proteiny silně interagují s proteinem GL50803_16424, samotný GL50803_16424 má mnoho jiných interakčních partnerů z dalších buněčných organel/cytosolu. Navíc některé proteiny s velmi pravděpodobně interagujícími s proteinem GL50803_16424 mají experimentálně určenou lokalizaci do oblasti ventrální disku, tedy do místa, kde byla původně určena lokalizace i proteinu GL50803_16424 (Hagen et al., 2011).

Výsledná data z analýzy hmotnostní spektrometrie crosslinkovaného proteinu GL50803_16424 byly rozříděna do dvou kategorií: i) proteiny, které se vyskytovaly ve větším množství ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424; ii) proteiny, které se vyskytovaly pouze ve vzorku crosslinkovaného GL50803_16424. V první kategorii převažovaly mezi nejlepšími výsledky proteiny endoplazmatického retikula. Nejvíce „nabohacený“ protein Bip (GL50803_17121) je homologem Hsp70, nacházejícího se v lumen endoplazmatického retikula a podílí se na skládání protein uvnitř ER a na jejich translokaci přes membránu ER (Soltys et al., 1996). Mezi dalšími koprecipitujícími proteiny se nacházely proteiny ze skupiny protein disulfid izomeráz (PDI), opět enzymy typické pro endoplazmatické retikulum. V *G.intestinalis* se protein disulfid izomerázy účastní hlavně skládání na cystein bohatých proteinů označovaných jako VSP (z angl. variant-specific surface proteins), přítomných na povrchu trofozoita a podílejících se na antigenní variaci *G. intestinalis* (Davids et al., 2006; Prucca and Lujan, 2009). Několik proteinů z rodiny VSP bylo určeno jako velmi pravděpodobné interakční proteiny GL50803_16424. Proteiny VSP přítomné ve vzorku crosslinkovaných proteinů *G. intestinalis*, jsou většinou považovány z kontaminaci spojené s touto metodou, avšak v kontextu s našim proteinem se může jednat o skutečné interakční partnery GL50803_16424.

Další skupinou proteinů přítomnou v našich výsledcích byly NEK kinázy, obsahující ankyrinové repetice. Tuto vlastnost měl i další výsledný protein z rodiny proteinů 21.1. Určeny byly i proteiny alfa-giardiny patřící do rodiny annexinů, které jsou typické pro svou Ca^{2+} dependentní vazbu na fosfolipidy periferních membrán (Barton et al., 1991). Jako signifikantní proteiny koprecipitující s proteinem GL50803_16424 byly určeny alfa-giardiny 1,11,7.3,2 a 6. Jedná se o homology cytoskeletárních proteinů a imunoreaktivní proteiny přítomné v akutních fázích gardiízy (Palm et al., 2005; Weiland et al., 2005). Vzhledem k tomu, že některé

z alfa-giardinů mají vysokou úroveň transkripce, je možné, že výskyt těchto proteinů ve výsledcích crosslink experimentu znamená pouze kontaminaci cytoskeletárními proteiny, jejichž hojné zastoupení v buňce ovlivnilo jejich statistický význam v našich datech (Palm et al., 2003; Weiland et al., 2005). Pro ověření, zda identifikované proteiny skutečně s proteinem GL50803_16424 interagují, bude nutné provést další experimenty potvrzující funkční spojení a kolokalizaci těchto proteinů. Z našich získaných dat, nelze tedy jednoznačně určit oblast působení proteinu GL50803_16424. Navzdory námi získaným výsledkům z mikroskopicky určené lokalizace proteinu GL50803_16424 se v tomto případě nabízí možnost dvojí lokalizace tohoto proteinu v buňkách *G. intestinalis*.

6.5 Shrnutí

Ze souhrnu dat vyplývá, že protein GL50803_16424 má buď velmi složitou topologii, nebo může mít dvojí lokalizaci. Je patrný kontakt proteinu GL50803_16424 s mitosomy/mitosomálními proteiny (tvrzení podpořené daty Martincové a kol., Rout a kol. a naším určením lokalizace), na druhou stranu však interaguje s proteiny endoplazmatického retikula, případně dalšími proteiny sekretorické dráhy, z nichž některé mají experimentálně určenou lokalizaci do ventrálního disku. Jakou funkci by protein GL50803_16424 mohl mít nebylo možné z našich dat určit, nicméně jsme specifikovali oblast, na kterou by se měly zaměřit následující experimenty.

7 Závěr

V této práci byl charakterizován jeden z nově objevených proteinů GL50803_16424, jehož lokalizace byla původně určena v oblasti ventrálního disku a později v oblasti mitosomů *G. intestinalis*. Pro vyjasnění těchto protichůdných výsledků, byla lokalizace proteinu v naší práci ověřena několika mikroskopickými přístupy využívající detekce přirozeného proteinu pomocí specifické protilátky. Rozhodující výsledky přinesla až metoda superrezoluční mikroskopie STED. Ta ukázala přítomnost proteinů GL50803_16424 v těsné blízkosti mitosomů.

Spolu s nejistou lokalizací byla neznámá i funkce proteinu GL50803_16424. Bylo zjištěno, že tento protein patří do proteinové rodiny myelodysplasia-myeloid leukemia factor 1-interacting protein (Mlf1IP), jejíž původ je odvozen od lidského proteinu myeloid leukemia factor 1. Ten je u lidí spojen s onemocněním myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu. Další protein z této proteinové rodiny lze najít i u *Drosophila melanogaster*. Tato strukturní homologie však nenaznačila jakoukoli funkční spojitost s proteinem GL50803_16424.

Vzhledem k obtížnosti zkoumání nejen mitosomálních proteinů organismu *G. intestinalis*, jsme v naší práci použili již vyzkoušenou metodu enzymatického značení proteinů *in vivo*, využívající enzymu biotin ligázy a biotin akceptorového peptidu. Pomocí tohoto přístupu jsme analyzovali možné interakční partnery proteinu GL50803_16424, mezi kterými bylo možné najít i některé proteiny mitosomální, většinou však šlo o proteiny spojené s endoplazmatickým retikulem.

Dále byly zkoumány vlastnosti proteinu GL50803_16424 zkouškami, kdy byla ke vzorku obsahující i tento protein exogenně přidána proteáza trypsin a uhličitan sodný. Výsledky těchto zkoušek ukázaly, že protein GL50803_16424 je solubilní a v prostředí buňky chráněn membránou.

Práce rozšířila znalosti o jednom z proteinů, který je úzce spjat s unikátní organelou mitosomem, jejíž proteom obsahuje jen dvě desítky identifikovaných proteinů s určenou funkcí.

8 Seznam použité literatury

- Abodeely, M., Dubois, K. N., Hehl, A., Stefanie, 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.
- Acosta-Virgen, K., Chávez-Munguía, B., Talamás-Lara, D., Lagunes-Guillén, A., Martínez-Higuera, A., Lazcano, A., Martínez-Palomo, A. and Espinosa-Cantellano, M.** (2018). *Giardia lamblia*: Identification of peroxisomal-like proteins. *Exp. Parasitol.* 191, 36–43.
- Adam, R. D.** (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447–75.
- 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.
- 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, D526–30.
- Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S. and Crumpton, M. J.** (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur. J. Biochem.* 198, 749–760.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E.** (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- Bernander, R., Palm, J. E. and Svärd, S. G.** (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.* 3, 55–62.
- Bingham, A. K. and Meyer, E. A.** (1979). *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature* 277, 301–302.
- Bingham, A. K., Jarroll, E. L., Meyer, E. A. and Radulescu, S.** (1979). *Giardia* sp.: Physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* 47, 284–291.

- Bras, S., Martin-Lannere, S., Gobert, V., Auge, B., Breig, O., Sanial, M., Yamaguchi, M., Haenlin, M., Plessis, A. and Waltzer, L.** (2012). Myeloid leukemia factor is a conserved regulator of RUNX transcription factor activity involved in hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4986–4991.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R. and Upcroft, P.** (1998). Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* 28, 149–64.
- Burki, F., Corradi, N., Sierra, R., Pawlowski, J., Meyer, G. R., Abbott, C. L. and Keeling, P. J.** (2013). Phylogenomics of the intracellular parasite *Mikrocytos mackini* reveals evidence for a mitosome in rhizaria. *Curr. Biol.* 23, 1541–1547.
- Cacciò, S. M. and Ryan, U.** (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 75–80.
- Carpenter, M. L. and Cande, W. Z.** (2009). Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot. Cell* 8, 916–9.
- Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. A.** (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* 90, 1103–1163.
- Dagley, M. J., Dolezal, P., Likić, 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.
- Davids, B. J., Reiner, D. S., Birkeland, S. R., Preheim, S. P., Cipriano, M. J., McArthur, A. G. and Gillin, F. D.** (2006). A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS one* 1, e44.
- Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubáková, Z., Bursac, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T. and Tachezy, J.** (2005). *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10924–9.
- 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.

- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953–971.
- Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Schupp, D. E., Shields, J. M., Jarroll, E. L., Sauch, J. F. and Pawley, J. B.** (1990). High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 625–632.
- Feely, D. E. and Dyer, J. K.** (1987). Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J. Protozool.* 34, 80–3.
- Filice, F. P.** (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zoology* 57, 53–146.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., et al.** (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279–D285.
- Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D. S., Palm, D., Andersson, J. O., Andersson, B. and Svärd, S. G.** (2009). Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: Is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog.* 5, e1000560.
- Friend, D. S.** (1966). The fine structure of *Giardia muris*. *J. Cell Biol.* 29, 317–32.
- Gakh, O., Cavadini, P. and Isaya, G.** (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 63–77.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The proteomics protocols handbook*, Humana Press pp. 571–607.
- Gillin, F. D., Reiner, D. S., Gault, M. J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A. and Sauch, J. F.** (1987). Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro*. *Science* 235, 1040–3.
- Gillin, F. D., Reiner, D. S. and Boucher, S. E.** (1988). Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect. Immun.* 56, 705–7.

- Gillin, F. D., Reiner, D. S. and McCaffery, J. M.** (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 679–705.
- Hagen, K. D., Hirakawa, M. P., House, S. A., Schwartz, C. L., Pham, J. K., Cipriano, M. J., De La Torre, M. J., Sek, A. C., Du, G., Forsythe, B. M., et al.** (2011). Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1442.
- Hehl, A. B., Regos, A., Schraner, E. and Schneider, A.** (2007). Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS One* 2, e488.
- Howarth, M. and Ting, A. Y.** (2008). Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat. Protoc.* 3, 534–45.
- Jedelsky, P. L., Dolezal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smid, O., Hrdy, I., ??edinov??, M., Marcincikova, 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, 15–21.
- Jiménez-García, L. F., Zavala, G., Chávez-Munguía, B., Ramos-Godínez, M. del P., López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M. de L., Montañez, C., Hehl, A. B., Argüello-García, R. and Ortega-Pierres, G.** (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* 38, 1297–1304.
- 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. I.** (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 with bile medium supplemented. *Trop. Med. Hyg.* 77, 487-488.
- 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.
- 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.

- Ladeira, R. B., Freitas, M. A. R., Silva, E. F., Gontijo, N. F. and Gomes, M. A.** (2005). Glycogen as a carbohydrate energy reserve in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Parasitol. Res.* 96, 418–421.
- LaGier, M. J., Tachezy, J., Stejskal, F., Kutisova, K. and Keithly, J. S.** (2003). Mitochondrial-type iron-sulfur cluster biosynthesis genes (IscS and IscU) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology* 149, 3519–3530.
- 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.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M. and Sogin, M. L.** (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int. J. Parasitol.* 40, 1063–1074.
- 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, 80–9.
- Léon-Avila, G. and Tovar, J.** (2004). Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* 150, 1245–1250.
- Lill, R.** (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Lill, R. and Kispal, G.** (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 352–6.
- Lindmark, D. G. and Müller, M.** (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248, 7724–8.
- Luján, H. D., Marotta, A., Mowatt, M. R., Sciaky, N., Lippincott-Schwartz, J. and Nash, T. E.** (1995). Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 270, 4612–8.

- Manning, G., Reiner, D. S., Lauwaet, T., Dacre, M., Smith, A., Zhai, Y., Svard, S. and Gillin, F. D.** (2011). The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol.* 12, R66.
- Marti, M. and Hehl, A. B.** (2003). Encystation-specific vesicles in *Giardia*: a primordial Golgi or just another secretory compartment? *Trends Parasitol.* 19, 440–6.
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Köhler, P. and Hehl, A. B.** (2003). The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell* 14, 1433–47.
- Martincová, E., Voleman, L., Najdová, V., De Napoli, M., Eshar, S., Gualdrón, M., Hopp, C. S., Sanin, D. E., Tembo, D. L., Van Tyne, D., et al.** (2012). Live imaging of mitosomes 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* mitosomes using *in vivo* enzymatic tagging. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2864–2874.
- McNally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K. and Dawson, S. C.** (2018). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *bioRxiv* 358598.
- Mei, K., Li, Y., Wang, S., Shao, G., Wang, J., Ding, Y., Luo, G., Yue, P., Liu, J. J., Wang, X., et al.** (2018). Cryo-EM structure of the exocyst complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 139–146.
- Midlej, V. and Benchimol, M.** (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitol. Int.* 58, 72–80.
- Midlej, V., Meinig, I., de Souza, W. and Benchimol, M.** (2013). A new set of carbohydrate-positive vesicles in encysting *Giardia lamblia*. *Protist* 164, 261–271.
- Midlej, V., Souza, W. de and Benchimol, M.** (2017). The endomembrane system of *Giardia intestinalis*. In *Current Topics in Giardiasis*, InTech.

- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L.** (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3, 29–38.
- 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* 317.5846, 1921–1926.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C. and Peng, Z.-Y.** (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13, 1435–48.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889–897.
- Neupert, W.** (1997). Protein import in mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 863–917.
- Ohno, K., Takahashi, Y., Hirose, F., Inoue, Y. H., Taguchi, O., Nishida, Y., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.** (2000). Characterization of a *Drosophila* homologue of the human myelodysplasia/myeloid leukemia factor (MLF). *Gene* 260, 133–143.
- Palm, J. E. D., Weiland, M. E. -L., Griffiths, W. J., Ljungström, I. and Svärd, S. G.** (2003). Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J. Infect. Dis.* 187, 1849–1859.
- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winięcka-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.
- Piva, B. and Benchimol, M.** (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol. Cell* 96, 735–746.
- Prucca, C. G. and Lujan, H. D.** (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell. Microbiol.* 11, 1706–1715.

- 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.
- Ramesh, M. A., Malik, S. B. and Logsdon, J. M.** (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes: Evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr. Biol.* 15, 185–191.
- Regoes, A., Zourmpanou, 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.*
- Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N. and Truscott, K. N.** (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 291–336.
- Reiner, D. S., McCaffery, M. and Gillin, F. D.** (1990). Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 142–53.
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A. and Kamikawa, R.** (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Curr. Biol.* 27, R1177–R1192.
- 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, 1–32.
- 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.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Šmíd, O., Matušková, A., Harris, S. R., Kučera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutějová, 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, P. D., Gillin, F. D., Spira, W. M. and Nash, T. E.** (1982). Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology* 83, 797–803.
- 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.
- Sogayar, M. I. L., Gregório, E. A. and Gregório, E. A.** (1991). Ultrastructure of *Giardia duodenalis* trophozoites group from hamster: some relevant aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 443–446.
- Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alonso, R. A. and Peattie, D. A.** (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243, 75–7.
- 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(7), 1909–17.
- Summerton, J.** (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 141–58.
- 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, 123–132.
- Sun, Y., Fu, A., Xu, W., Chao, J. R., Moshiach, S. and Morris, S. W.** (2015). Myeloid leukemia factor 1 interfered with Bcl-XL to promote apoptosis and its function was regulated by 14-3-3. *J. Physiol. Biochem.* 71, 807–821.
- 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, 1013–1021.
- 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, 172–176.

- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J.** (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740.
- Van Der Giezen, M.** (2009). Hydrogenosomes and mitosomes: Conservation and evolution of functions 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(3), 221–231.
- Voleman, L., Najdřová, V., ÁstvaldssonÁsgeir, Tumová, P., Einarsson, E., Švindřych, Z., Hagen, G. M., Tachezy, J., Svård, S. G. and Doleřal, 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.
- Weiland, M. E.-L., McArthur, A. G., Morrison, H. G., Sogin, M. L. and Svård, S. G.** (2005). Annexin-like alpha giardins: A new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 35, 617–626.
- 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., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y.** (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.
- Yoneda-Kato, N., Look, A. T., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., Cohen, K. J., Carroll, A. J. and Morris, S. W.** (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12, 265–75.
- 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.