

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Lukáš Novák

**Mitochondrie *Trimastix pyriformis***

Mitochondrion of *Trimastix pyriformis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Zuzana Zubáčová, Ph.D.

Praha, 2013

## **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, 15. 08. 2013

.....

## **Poděkování**

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Zuzaně Zubáčové, Ph.D. za odborné vedení této práce, neocenitelné rady a trpělivost. Dále patří velký dík všem členům naší skupiny i dalších skupin Katedry parazitologie za pomoc s laboratorní prací, zejména pak Mgr. Vojtěchu Vackovi. Také děkuji všem svým blízkým za jejich podporu. Zvláštní dík patří též RNDr. Heleně Kulíkové a Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za rychlou pomoc v nouzi největší.

# Obsah

Obsah .....	4
1. Abstrakt .....	7
2. Úvod .....	8
3. Literární přehled.....	9
3.1. Historie objevování a popisu druhů rodu <i>Trimastix</i> .....	9
3.2. Fylogenetická pozice rodu <i>Trimastix</i> mezi eukaryoty .....	10
3.3. Morfologie <i>Trimastix pyriformis</i> .....	11
3.4. Ultrastruktura <i>Trimastix pyriformis</i> .....	12
3.4.1. Jádro a endomembránový systém .....	12
3.4.2. Cytoskelet.....	12
3.4.3. Bičíky .....	12
3.4.4. Mitochondriální organely.....	13
3.5. Pohyb <i>Trimastix pyriformis</i> .....	13
3.6. Životní cyklus <i>Trimastix pyriformis</i> .....	13
3.6.1. Vývojová stádia .....	13
3.6.2. Dělení .....	13
3.7. Metabolismus <i>Trimastix pyriformis</i> .....	14
3.7.1. Energetický metabolismus .....	14
3.7.2. Další metabolické dráhy potenciálně lokalizované v redukované mitochondrii .....	16
3.8. Dosavadní znalosti o potenciální mitochondriální organelle .....	18
3.9. Redukované mitochondrie některých dalších studovaných protist.....	20
3.9.1. Proteom hydrogenozomu <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	20
3.9.2. Proteom mitozomu <i>Giardia intestinalis</i> .....	23
3.9.3. Proteom mitozomu <i>Entamoeba histolytica</i> .....	24
4. Cíle práce.....	26
5. Metody.....	27
5.1. Kultivace a práce s buňkami <i>T. pyriformis</i> .....	27
5.1.1. Příprava média ATCC 802 .....	27
5.1.2. Příprava média 100% LB, 3% LB a LB agaru.....	27

5.1.3.	Kultivace <i>T. pyriformis</i> .....	27
5.1.4.	Filtrace kultury s <i>T. pyriformis</i> .....	28
5.1.5.	Příprava poly-L-lysinovaných sklíček .....	28
5.1.6.	Paraformaldehydová fixace buněk <i>T. pyriformis</i> pro imunofluorescenční mikroskopii .....	28
5.1.7.	Jednoduchá frakcionace <i>T. pyriformis</i> .....	29
5.2.	Kultivace a práce se <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
5.2.1.	Příprava média YPD a ploten YPD a (-)URA pro kultivaci <i>S. cerevisiae</i> .....	29
5.2.2.	Kultivace <i>S. cerevisiae</i> YPH499 (ATCC: 204679) .....	30
5.2.3.	Příprava vektorů pro transfekci kvasinek.....	30
5.2.4.	Transformace <i>S. cerevisiae</i> .....	31
5.2.5.	Fixace <i>S. cerevisiae</i> pro imunofluorescenční mikroskopii .....	32
5.2.6.	Příprava lyzátu <i>S. cerevisiae</i> pro analýzu imunoblotem.....	33
5.3.	Práce s nukleovými kyselinami.....	34
5.3.1.	Izolace RNA pomocí ethanol-chloroformové extrakce .....	34
5.3.2.	Selekce mRNA a syntéza cDNA.....	34
5.3.3.	Polymerázová řetězová reakce – PCR .....	35
5.3.4.	Agarózová elektroforéza .....	35
5.3.5.	Izolace plazmidů metodou „miniprep“ .....	36
5.3.6.	Sekvenování DNA Sangerovou metodou. ....	36
5.3.7.	Štěpení plazmidů restričními endonukleázami .....	36
5.4.	Práce s proteiny.....	37
5.4.1.	Příprava rekombinantního proteinu .....	37
5.4.2.	Test solubility rekombinantního proteinu .....	39
5.4.3.	Denaturační purifikace rekombinantního proteinu .....	39
5.4.4.	Separční elektroforéza SDS PAGE.....	40
5.4.5.	Příprava protilátek imunizací potkanů .....	41
5.4.6.	Zpracování krve odebrané laboratorním potkanům .....	41
5.4.7.	Polyakrylamidová denaturační proteinová elektroforéza (SDS PAGE) .....	41
5.4.8.	Imunoblot – „Western Blot“ .....	43
5.5.	Bioinformatické metody.....	44
6.	Výsledky.....	45
6.1.	Analýza EST sekvencí.....	45
6.1.1.	Syntéza FeS center .....	45

6.1.2.	Rubrerythrin .....	50
6.2.	Příprava protilátek a imunologické metody lokalizace proteinů .....	52
6.2.1.	H-protein GCS.....	52
6.2.2.	Cpn60 .....	55
6.2.3.	Hydrogenáza 2.....	58
6.3.	Transformace <i>S. cerevisiae</i> geny pro proteiny <i>T. pyriformis</i> .....	60
6.3.1.	Hydrogenáza 2.....	60
6.3.2.	Hydrogenáza 3.....	62
7.	Diskuze .....	64
7.1.1.	SUF systém syntézy FeS center .....	64
7.1.2.	Rubrerythrin .....	66
7.1.3.	Systém štěpení glycinu .....	66
7.1.4.	Hydrogenázy.....	67
8.	Závěry .....	68
9.	Seznam použitých zkratk.....	69
10.	Seznam použité literatury .....	72
	PŘÍLOHA .....	77

## 1. Abstrakt

Volně žijící mikroaerofilní prvok *Trimastix pyriformis* je blízce příbuzný oxymonádám, které představují největší eukaryotický taxon bez známé mitochondrie. Na rozdíl od oxymonád byla v buňce *T. pyriformis* záhadná redukovaná mitochondrie nalezena. V EST datech *T. pyriformis* byla identifikována řada genů, jejichž produkty mohou být lokalizovány v mitochondrii. Jsou mezi nimi geny pro všechny komponenty systému štěpení glycinu, [FeFe]hydrogenázy a typicky mitochondriální protein Cpn60. Za účelem lokalizace těchto proteinů jsme provedli experimenty. Naše výsledky ukazují, že systém štěpení glycinu je skutečně lokalizován v mitochondrii. Výsledky experimentů provedených s cílem lokalizovat dvě hydrogenázy také naznačují mitochondriální lokalizaci. Nejsou ale zcela přesvědčivé. Pokus o lokalizaci Cpn60 selhal. Dále jsme identifikovali několik nových genů v transkriptech *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. (Oxymonadida). Jde o geny kódující komponenty SUF systému syntézy FeS center a peroxidázu rubrerythrin.

**Klíčová slova:** *Trimastix*, *Monocercomonoides*, mitochondrie, hydrogenozom, mitozom, hydrogenáza, systém štěpení glycinu, SUF systém.

### Abstract

Free-living microaerophilic protist *Trimastix pyriformis* is closely related to oxymonads which are the largest eukaryotic group without any known mitochondrion. In contrast to oxymonads, an enigmatic reduced mitochondrion has been found in the cell of *T. pyriformis*. In EST data of *T. pyriformis*, a number of genes has been identified whose products are putatively localized in the mitochondrion. Among these are genes for all the components of the glycine cleavage system, [FeFe]hydrogenases and the mitochondrial marker Cpn60. We performed experiments in order to determine the cellular localization of these proteins. Our results show that the glycine cleavage system is localized in the mitochondrion. Results of the experiments carried out in order to localize two hydrogenases suggest also the mitochondrial localization but are not fully convincing. The attempt to localize Cpn60 has failed. We have also identified a set of new genes in transcripts of *T. pyriformis* and *Monocercomonoides* sp. (Oxymonadida). These genes code for some components of the SUF system of FeS cluster synthesis and a peroxidase rubrerythrin.

**Key words:** *Trimastix*, *Monocercomonoides*, mitochondrion, hydrogenosome, mitosome, hydrogenase, glycine cleavage system, SUF system.

## 2. Úvod

*Trimastix pyriformis* je volně žijící mikroaerofilní bakteriovorní bičíkovec s typicky exkavátní morfologií. Je řazen spolu s oxymonádami do taxonu Preaxostyla v rámci skupiny Metamonada v eukaryotické „říši“ Excavata. Oxymonadida, nejbližší příbuzní rodu *Trimastix*, jsou největší z eukaryotických skupin, u kterých dosud nebyla objevena mitochondrie, ani její redukovaný homolog. Naproti tomu byly v buňce hned 3 druhů rodu *Trimastix*, včetně *T. pyriformis*, identifikovány orgány ultrastrukturně připomínající hydrogenozomy, tedy redukované mitochondrie některých anaerobních protist, které svým metabolismem produkují vodík. Dalším důvodem, proč předpokládat přítomnost redukované mitochondrie v buňce trimastixe je, že v jeho transkriptomu bylo identifikováno množství typických mitochondriálních genů.

Prohlásit, že se v buňce *T. pyriformis* skutečně nacházejí mitochondriální orgány, ale není možné bez experimentálního potvrzení lokalizace domněle mitochondriálních proteinů. Snaha o získání experimentálních dokladů přítomnosti redukované mitochondrie, případně jejích fyziologických funkcí, je dlouhodobým projektem Skupiny evoluční protistologie na PŘF UK a je také předmětem této práce.

Výzkum buněčné biologie rodu *Trimastix* je zajímavý především ve fylogenetickém kontextu. Pokud se podaří prokázat, že oxymonády jsou skutečně (s největší pravděpodobností sekundárně) amitochondriální a naopak *Trimastix* obsahuje jakousi formu redukované mitochondrie, pak se z taxonu Preaxostyla může stát modelová skupina pro studium reduktivní evoluce mitochondrie. Měli bychom totiž k dispozici potomky organismů z různých fází procesu redukce od typické aerobní mitochondrie u posledního společného předka exkavát, respektive eukaryot, přes rozličné redukované anaerobní mitochondrie u jednotlivých skupin metamonád, redukovanou anaerobní mitochondrii dosud neznámých vlastností u trimastixe, až po úplnou amitochondrialitu oxymonád.



### 3. Literární přehled

#### 3.1. Historie objevování a popisu druhů rodu *Trimastix*

Rod *Trimastix* byl poprvé popsán roku 1882 britským protistologem W. Sevillem Kentem v prvním díle jeho třísvazkového pojednání *Manual of the Infusoria* (Kent, 1882). Autor do něj umístil jediný druh: *T. marina*, ten se tak stal typovým druhem celého rodu. Druhové jméno je odvozené od toho, že bičíkovci byli objeveni ve vzorku mořské vody. Konkrétně vody obsahující rozkládající se zbytky rostlin se silným bakteriálním povlakem; z lokality u St. Heliers na ostrově Jersey.

Vzhled buněk popsal W. S. Kent takto: „Animalkula nahá, zcela volně plovoucí, více či méně oválná nebo pyriformní, s laterálně rozšířeným membranózním okrajem; bičíky v počtu tří, anteriorně uložené, jeden vibrující mířící kupředu, dva odchýlené a vlečené posteriorně; endoplast a kontraktilní váček viditelné, žádný zřetelný ústní otvor“.

Oproti dnešním znalostem se v tomto popisu vyskytují dvě chybná tvrzení. První se odrazilo přímo ve jméně rodu (tri - tři, mastix - brva). W. S. Kent patrně přehlédl jeden bičík, neboť všechny dosud formálně popsané druhy rodu *Trimastix* jsou čtyřbičíkaté. Druhou chybou je domnělá nepřítomnost „ústního otvoru“. Pozdější studie ukázaly, že *T. marina* má na dně ventrální rýhy trvale utvořený cytofarynx (Simpson et al., 2000).

Sladkovodní druh *T. pyriformis*, který je předmětem této práce, byl popsán o 13 let později jako *Tetramitus pyriformis* v článku *Flagellatenstudien* německého protistologa G. Klebse (Klebs, 1893). O necelé století později byl přeřazen do rodu *Percolomonas*. Dodnes platné zařazení do rodu *Trimastix* provedli Bernard et al. (2000) na základě větší morfologické a ultrastrukturní podobnosti typovému druhu *T. marina* než jakémukoli druhu skupiny *Heterolobosea*, kam rody *Tetramitus* i *Percolomonas* patří.

Třetím objeveným druhem se stal *T. convexa*, jehož popis publikoval A. Hollande v prvním díle *Traité de Zoologie* (editor: P. P. Grassé) roku 1952 (Hollande, 1952). Tento druh by později synonymizován s *T. pyriformis* (Bernard et al., 2000). Synonymie ovšem není všeobecně přijímána. Mezi popisy obou organizmů lze vysledovat 3 rozdíly: 1) *T. pyriformis* je menší, dosahuje délky maximálně 17  $\mu\text{m}$ , zatímco u *T. convexa* byla zaznamenána délka až 20  $\mu\text{m}$ . 2) *T. pyriformis* má v anteriorním mikrotubulárním kořeni 3 nebo 4 mikrotubuly, zatímco *T. convexa* jen 2. 3) V buňce *T. convexa* se nacházejí fibrily asociované s distálním koncem levého ventrálního kořene, které u *T. pyriformis* chybí (O'Kelly et al. 1999).

Ve stejném článku, který synonymizoval *T. convexa* s *T. pyriformis* (Bernard et al., 2000), se setkáváme s dosud posledním formálně popsaným druhem, *T. inaequalis*. Ten obývá mořské biotopy a od ostatních druhů rodu *Trimastix* je morfologicky odlišitelný díky nestejně délce laterálních bičíků.

Dále je zde uveden nový popis druhu *T. marina* na základě izolátů ze sladkovodních a brakických lokalit. Buňky z brakických lokalit byly menší a měly relativně delší bičíky než buňky z lokalit

sladkovodních. Žádná morfologická diskontinuita, která by ospravedlňovala taxonomické rozlišení sladkovodních a brakických kmenů, ale nebyla zaznamenána (Bernard et al., 2000).

V několika internetových taxonomických databázích (biolib.cz, eol.com, gni.globalnames.org, portal.ubio.org) je uveden další druh: *Trimastix elaverinus* Dumas, 1930, jehož formální popis nebyl autor této práce s to dohledat.

V současné době (srpen 2013) je tedy formálně popsáno 3 až 5 druhů rodu *Trimastix*: *T. marina*, *T. pyriformis* a s ním možná synonymní *T. convexa*, *T. inaequalis* a *T. elaverinus*, pokud tento skutečně existuje.

### 3.2. Fylogenetická pozice rodu *Trimastix* mezi eukaryoty

Objevitel rodu *Trimastix*, W. S. Kent (1880), jej ve svém systému na základě povrchní morfologické podobnosti, zejména domnělé přítomnosti (pouhých) 3 bičíků, umístil do čeledi Trimastigidae spolu s rody *Collodictyon*, *Trichomonas* a *Dallingeria*.

První vážný pokus o zařazení trimastixe do vyšší přirozené taxonomické jednotky podnikl Pierre P. Grassé v roce 1952, kdy jej spolu s trichomonádami zařadil do taxonu Trichozoa a to mimo jiné na základě přítomnosti výrazného Golgiho aparátu a hydrogenozomů (Grassé, 1952), v té době ovšem u trimastixe nepotvrzených.

Proti tomuto názoru položili mnoho závažných ultrastrukturních dokladů Brugerolle a Patterson roku 1997. Argumentovali například jiným uspořádáním bazálních tělísek či nepřítomností zásadních cytoskeletárních struktur typických pro Parabasalia, jako je kosta, parabazální fibrily nebo axostyl (Brugerolle & Patterson, 1997). Průběh mitózy je u trimastixe také velmi odlišný od parabasalidů, jak později ukázali O'Kelly et al. (1999).

Brugerolle a Patterson srovnávají trimastixe na ultrastrukturní úrovni s retortamonádami a nacházejí mezi nimi mnoho společných znaků. Oba taxony se podobají ve struktuře mastigontu, cytoskeletu ventrální rýhy a přítomnosti a struktuře ploutviček na posteriorním bičíku (Brugerolle & Patterson, 1997). K těmto společným znakům přidal O'Kelly et al. (1999) navíc podobnosti v průběhu mitózy, a sice dělicí polovřeténka vycházející z komplexů bazálních tělísek. Na druhou stranu se liší tím, že mitóza buňky trimastixe je otevřená (jaderná membrána se rozpadá) a není během ní patrné jadérko.

O'Kelly et al. (1999) srovnávají trimastixe také s jakobidy a rodem *Malawimonas*, který byl v době vydání jejich článku mezi jakobidy řazen, a nalézají ještě více podobností. Dané taxony se shodují v umístění a orientaci Golgiho aparátu, v detailní struktuře pravého a levého ventrálního mikrotubulárního kořene i přítomnosti fibril A, B, C a I, které byly poprvé identifikovány právě u zástupců skupiny Jakobida, *Jakoba libera* a *Reclinomonas americana*. Ze všech těchto organizmů je pak, podle O'Kelly et al. (1999), trimastixovi nejpodobnější *Malawimonas*. Usuzují tak z detailů stavby levého ventrálního kořene a přítomnosti anteriorního kořene. Jakobidi i *Malawimonas* se ale od trimastixe liší přítomností pouze jediné ploutvičky na posteriorním bičíku. *Malawimonas jakobiformis* má na posteriorním bičíku ventrální ploutvičku, zatímco jakobidi rodů *Reclinomonas*, *Histiona* a *Jakoba* mají ploutvičku umístěnou dorzálně.

Molekulární fylogenetika vnesla do otázky fylogenetické pozice trimastixe překvapivý zvrat, když Dacks et al. (2001) odhalili jeho blízkou příbuznost skupině Oxymonadida. Fylogenetickou analýzu provedli na sekvencích genů pro RNA malé ribozomální podjednotky 3 izolátů trimastixe a 1 oxymonády, konkrétně *Pyrsonympha* sp. Analýza ukázala dobře podpořenou sesterskou pozici trimastixe a pyrsonymphy, ale na druhou stranu nezjistila žádnou specifickou příbuznost těchto dvou rodů jakémukoli jinému eukaryotickému taxonu.

Fylogenetická pozice trimastixe jako sesterského taxonu oxymonád získala i ultrastrukturní podporu, když si A. G. B. Simpson povšiml podobnosti ultrastruktury fibrily I u obou taxonů. Ta u oxymonád tvoří parakrystalinní součást typické cytoskeletální struktury, preaxostylu. Na základě této homologie A. G. B. Simpson navrhl zařadit trimastixe a oxymonády do nového společného taxonu Preaxostyla, v rámci skupiny Metamonada patřící do eukaryotické „říše“ Excavata (Simpson et al., 2002; Simpson, 2003). Tuto pozici dodnes nikdo nezpochybnil a byla navíc podpořena dalšími molekulárně fylogenetickými studiemi (Hampl et al., 2009).

Ve světle této, solidně podpořené, fylogenetické pozice lze znaky sdílené trimastixem s jakobidy (a snad i *Malawimonas*) označit za plesiomorfie celé „říše“ Excavata a pokud se v exkavátech nachází kořen eukaryotického stromu, pak i za plesiomorfie všech eukaryot. Znaky sdílené s retortamonádami, dnes řazenými spolu s diplomonádami atd. do taxonu Fornicata, pak za plesiomorfie metamonád.

### 3.3. Morfologie *Trimastix pyriformis*

Zdravé interfázni buňky jsou oblé až protáhlé a měří (v závislost na konkrétním jedinci) 9 – 17  $\mu\text{m}$  na délku a 5 – 13  $\mu\text{m}$  na šířku. Pokud považujeme *T. pyriformis* a *T. convexa* za jeden a tentýž druh, pak délka buňky dosahuje až 20  $\mu\text{m}$ . Buňky mají rozlišenou konvexní dorzální stranu a planární až konkávní stranu ventrální. Anteriorní i posteriorní konce buňky jsou tupé. Na ventrální straně je umístěna výrazná ventrální rýha dosahující délky alespoň dvou třetin délky buňky. Jediné jádro je umístěno v první (anteriorní) třetině buňky. Subapikálně v oblasti anteriorního konce ventrální rýhy vycházejí z buňky 4 bičíky rozlišené na 1 anteriorní, 1 posteriorní a 2 laterální. Anteriorní bičík je delší než ostatní. Dosahuje délky zhruba dvojnásobku délky buňky. Posteriorní a laterální bičíky jsou dlouhé zhruba 1,5násobek délky buňky. Posteriorní bičík prochází ventrální rýhou. Na dně ventrální rýhy dochází k fagocytóze bakterií, které jsou do rýhy hnané činností posteriorního bičíku. Potravní vakuoly jsou patrné (O'Kelly et al., 1999).

V optickém mikroskopu se *T. pyriformis* liší od *T. marina* především velikostí. *T. marina* je výrazně větší – dosahuje až 30  $\mu\text{m}$  na délku (Simpson et al., 2000). Všechny bičíky *T. pyriformis* mají zhruba stejný průměr, zatímco anteriorní bičík *T. marina* je na své bázi rozšířen díky přítomnosti paraflagelární struktury (Simpson et al., 2000). *T. marina* má navíc na dně posteriorního konce ventrální rýhy vytvořený cytofarynx (Simpson et al., 2000), který u ostatních popsanych zástupců rodu chybí.

### 3.4. Ultrastruktura *Trimastix pyriformis*

#### 3.4.1. Jádro a endomembránový systém

Jádro obsahuje výrazné centrální jadérko a je obklopeno hustou sítí hrubého endoplazmatického retikula. Síť retikula je dále protažena k posteriornímu konci buňky. V buňce se nachází jediný Golgiho aparát umístěný v blízkosti bazálních tělísek bičíků a sice posteriorně a nalevo od nich. Orientován je *cis* stranou směrem k bazálním tělískům a *trans* stranou k jádru (O'Kelly et al., 1999). V buňce byly pozorovány potravní vakuoly obsahující bakterie a malá posteriorně umístěná kontraktilní vakuola (Bernard et al. 2000).

#### 3.4.2. Cytoskelet

Mastigont je tvořen 4 bazálními tělísky spolu se 4 mikrotubulárními kořeny, sekundárními mikrotubuly vycházejícími z anteriorního kořene a rozličnými fibrilami, které jsou asociovány jak s bazálními tělísky, tak s mikrotubulárními kořeny.

Bazální tělíska jsou umístěná asymetricky, a sice tak, že tělíska 2 (anteriorní bičík) a 3 (pravý laterální bičík) tvoří pár ve tvaru písmene L, kde tělísko 3 míří k pravé straně buňky a tělísko 2 míří ventrálně, zatímco tělísko 1 (posteriorní bičík) a 4 (levý laterální bičík) jsou umístěná křížem přes sebe. Pár 2 a 3 je umístěn anteriorně od páru 1 a 4, se kterým je spojen fibrózním materiálem. Bazální tělíska 2 a 3 jsou obě kolmá na tělísko 1.

Z bazálního tělíska 2 (anteriorní bičík) vychází jediný mikrotubulární kořen. Tvoří oblouk nejprve směřující anteriorně a později se stáječící k posteriornímu konci buňky. Obsahuje 3 nebo 4 mikrotubuly, u izolátů popsaných jako *T. convexa* jen 2, a po většině jeho délky z něj vycházejí jednotlivé sekundární mikrotubuly vyztužující dorzální stranu buňky.

Z bazálního tělíska 1 (posteriorní bičík) vycházejí 3 mikrotubulární kořeny. Levý ventrální kořen je na anteriorním konci, přiléhajícím k bazálnímu tělísku, tvořen dvěma mikrotubuly a dalších zhruba 10 mikrotubulů se přidává postupně dále posteriorně. Střední ventrální kořen sestává z jediného mikrotubulu, který se zhruba na úrovni posteriorního okraje rýhy přikládá k levému kořeni. Pravý ventrální kořen sestává v anteriorní části z blíže nezjištěného malého počtu mikrotubulů. Dále posteriorně se k nim přikládají další mikrotubuly, až jejich počet dosahuje zhruba 30. Tyto 3 ventrální mikrotubulární kořeny definují tvar ventrální rýhy a na jejím posteriorním konci se setkávají.

Ventrální mikrotubulární kořeny jsou asociovány s fibrózním materiálem tvořícím strukturu označované jako fibrily A, B, C a I (O'Kelly et al., 1999).

#### 3.4.3. Bičíky

Axonemy bičíků *T. pyriformis* mají standardní strukturu 9x2+2 a, na rozdíl od *T. marina*, nejsou asociovány s žádnými paraflagelárními strukturami. Všechny bičíky s výjimkou posteriorního jsou holé. Posteriorní bičík je opatřen dvěma ploutvičkami umístěnými zhruba ventrálně a dorzálně vzhledem k axonemě. Dorzální ploutvička začíná blíže tělu buňky než ploutvička ventrální. Obě ploutvičky jsou podepřeny parakrystalinní lamelou. Ventrální lamela je napojena na jeden

mikrotubulární dublet axonemy (O'Kelly et al., 1999). Napojení dorzální lamely na axonemu nebylo pozorováno, na rozdíl od *T. marina*, kde jsou obě lamely asociovány s 2 – 3 dublety. Bližší informace o ultrastruktuře lamel nejsou u *T. pyriformis* známy. Lamely ploutviček *T. marina* jsou zdokumentovány lépe. Jejich šířka se postupně zvětšuje, až dosáhne přibližně 1  $\mu\text{m}$ . Od axonemy jsou odděleny zhruba 200nm mezerou překlenutou jemnými fibrilami. Na lamelách je patrné žíhování o periodě 37 nm, rovnoběžné s axonemou. Okraje (vnějších 150 nm) ploutviček jsou širší než část přiléhající k axonemě, a ploutvička se tedy na průřezu směrem od axonemy k okraji rozšiřuje (Simpson et al., 2000).

#### **3.4.4. Mitochondriální organely**

V buňce žádného zástupce rodu *Trimastix* nebyly pozorovány klasické aerobní mitochondrie. Ultrastrukturní studie *T. convexa*, *T. pyriformis* a *T. marina* ovšem popisují podezřelé organely, které by mohly představovat redukované mitochondrie podobné hydrogenozomům. Tyto organely jsou obalené dvěma membránami, mají sférický, protáhlý nebo činkovitý tvar a velikost pohybující se mezi 0,2 a 1  $\mu\text{m}$ . Kristy nejsou přítomny. Matrix je heterogenní a elektrondenzní. V případě *T. marina* je zaznamenán počet zhruba 20 těchto organel v jedné buňce (Simpson et al., 2000).

### **3.5. Pohyb *Trimastix pyriformis***

Při plavání zabírá jak anteriorní, tak oba laterální bičíky. Buňky příležitostně rotují. Proximální část posteriorního bičíku je obvykle umístěna ve ventrální rýze a vlní se s krátkou vlnovou délkou a velkou amplitudou. Tento pohyb vytváří proud vody ženoucí částice potravy do ventrální rýhy, kde jsou fagocytovány. Posteriorní bičík se často jeví být připojen k posteriornímu okraji ventrální rýhy. Distanční konec posteriorního bičíku občas slouží k přichycení buňky k substrátu (Bernard et al. 2000).

### **3.6. Životní cyklus *Trimastix pyriformis***

#### **3.6.1. Vývojová stádia**

S výjimkou pohyblivých bičíkatých buněk (viz popis interfázních buněk) bylo pozorováno jediné další vývojové stádium a to pouze u jednoho kmene *T. pyriformis* (kmen 50562). Tímto stádiem jsou zakulacené cysty s tenkou stěnou a zachovanými bazálními tělísky i bičíky adherovanými k povrchu buňky (O'Kelly et al. 1999).

#### **3.6.2. Dělení**

Mitóza je otevřená. Dělicí vřeténko se rozpadá na dvě polovřeténka vycházející z komplexů bazálních tělísek. Dělení začíná v preprofázi zmnožením bazálních tělísek a objevením se nekořenových mikrotubulů. Bičíky jsou během dělení zachovány. Během metafáze a anafáze nebyla pozorována žádná jadérka (O'Kelly et al. 1999).

### 3.7. Metabolismus *Trimastix pyriformis*

Na žádném zástupci rodu *Trimastix* dosud nebyly provedeny žádné biochemické studie. Je to způsobeno zejména tím, že se tyto prvoky nikdy nepodařilo kultivovat v axenické kultuře bez živých bakterií. Proto jsou prakticky veškeré naše znalosti o metabolismu těchto prvoků založeny na molekulárních datech, konkrétně transkriptomických studiích. Jejich dosavadní výsledky jsou prezentovány v následujících kapitolách, zejména s přihlédnutím k metabolickým drahám potenciálně asociovaným s mitochondrií.

#### 3.7.1. Energetický metabolismus

##### 3.7.1.1. Glykolýza

Stechmann et al. (2006) našli v EST sekvencích *T. pyriformis* transkripty genů kódujících enzymy, které jsou potřebné pro 9 z 10 kroků glykolýzy. Jsou to tyto enzymy: hexokináza, fosfoglucoizomeráza (GPI), fruktózbisfosfátaldoláza (FBA), triózafosfátizomeráza (TPI), glycerinaldehydfosfátdehydrogenáza (GAPDH), fosfoglycerátkináza (PGK), fosfoglycerátmutáza (PGAM), enoláza, pyruvátkináza (PK) a pyruvátfosfát-dikináza (PPDK).

Poslední dva jmenované enzymy mohou v principu oba katalyzovat konverzi fosfoenolpyruvátu na pyruvát, tedy poslední krok glykolýzy. Liší se tím, že PK je ATP-dependentní enzym, zatímco PPDK operuje s pyrofosfátem. PPDK byl nalezen ve třicetkrát větším počtu EST než PK, což naznačuje větší míru exprese PPDK (Stechmann et al., 2006). To může souviset s vyšší efektivitou pyrofosfát-dependentních glykolytických enzymů (Mertens, 1991).

Minimálně 4 z těchto enzymů (FBA, GAPDH, PGK, PK) byly získány laterálním genovým přenosem z prokaryot. U dalších dvou enzymů (PGAM, PPDK) je tato možnost také pravděpodobná (Stechmann et al., 2006). Množství laterálně přenesených genů pro glykolytické enzymy je tedy u trimastixe srovnatelné s dalšími studovanými anaerobními prvoky, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* a *Entamoeba histolytica*. Autoři spekulují, že laterálně přenesené geny mohou být pro anaeroby výhodné, protože zvyšují efektivitu glykolýzy (Stechmann et al., 2006). Ta má pro anaeroby větší energetický význam než pro aeroby, u kterých je nejdůležitějším zdrojem energie ve formě ATP navazující Krebsův cyklus.

Zajímavé je, že dva z enzymů s jednoznačně eukaryotickým původem, TPI a enoláza, jsou zděděny po eukaryotických předcích i u ostatních studovaných anaerobů, kteří mají jinak také řadu dalších glykolytických genů získaných od bakterií. Naznačuje to, že výběr glykolytických genů, které jsou nahrazovány laterálním přenosem, není náhodný (Stechmann et al., 2006).

##### 3.7.1.2. Akonitáza

U aerobních eukaryot navazuje na glykolýzu Krebsův cyklus lokalizovaný v matrix mitochondrie a úzce funkčně spojený s elektronovým transportním řetězcem na vnitřní mitochondriální membráně a protonovým gradientem mezi matrix a mezimembránovým prostorem.

V transkriptomu *T. pyriformis* byl nalezen jediný enzym Krebsova cyklu, a sice akonitáza (Hampl et al., 2008) reverzibilně konvertující citrát přes cis-akonitát na isocitrát. U eukaryot se nacházejí dva

nepříbuzné varianty tohoto enzymu, jedna v mitochondriální matrix a jedna v cytosolu. V transkriptech trimastixe byly nalezeny obě verze, ale mitochondriální se zdá být přepisována více než cytosolická (Hampl et al., 2008). Vzhledem k pravděpodobné absenci ostatních nezbytných enzymů Krebsova cyklu, typických aerobních mitochondrií i jakéhokoli detekovatelného protonového gradientu (Zubáčová et al., 2013) v buňce trimastixe je fyziologická funkce akonitázy záhadou.

### 3.7.1.3. Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza

U anaerobních eukaryot jsou za glykolýzu zařazeny různé formy fermentace. Prvním enzymem typickým pro anaerobní metabolismus navazujícím na glykolýzu je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO). Tento enzym katalyzuje dekarboxylaci pyruvátu za vzniku acetyl-CoA a přenáší uvolněné elektrony na ferredoxin. U některých organismů (*Trichomonas*) je PFO lokalizován v matrix redukovaných mitochondrií (Müller et al., 2012), u jiných (*Giardia*, *Entamoeba*) v cytosolu (Reeves et al., 1977, Townson et al., 1996)

V transkriptech *T. pyriformis* byl objeven homolog PFO, jehož sekvence se větví sestersky ke dvěma sekvencím cytosolického PFO entamoeb. Množství EST (více než 0,2 %) obsahujících sekvenci tohoto genu naznačuje jeho relativně vysokou expresi (Hampl et al., 2008).

### 3.7.1.4. [FeFe]hydrogenázy a jejich maturázy

Podobně silně jako PFO jsou přepisované i geny pro 3 různé [FeFe]hydrogenázy (Hampl et al., 2008). Tento protein je klíčovým enzymem koncových reakcí energetického metabolismu u mnohých anaerobních eukaryot (i prokaryot) a může být lokalizován jak v cytosolu, tak v redukované mitochondrii. Katalyzuje přenos elektronů na koncový akceptor, proton, za vzniku vodíku. Redukované mitochondrie, ve kterých tato reakce probíhá, se nazývají hydrogenozomy (Müller et al., 2012).

Všechny 3 homology hydrogenázy nalezené v transkriptech trimastixe se sice liší jak délkou, tak sekvencí, ale tvoří silně podpořenou větev ve fylogenetických analýzách (Hampl et al., 2008). Jde tedy pravděpodobně o paralogy vzniklé dvojitou duplikací původního jediného genu v předkovi *T. pyriformis*. Sekvence hydrogenáz trimastixe se větví odděleně od naprosté většiny eukaryotických homologů a tvoří silně podpořenou větev obsahující 3 bakteriální sekvence a sekvenci pocházející z entamoeb (Hampl et al., 2008). Je tedy pravděpodobné, že byly získány laterálním genovým přenosem z bakterií do předka trimastixe nebo entamoeb a následně přeneseny mezi těmito dvěma eukaryoty ať už jedním neb druhým směrem. Případně mohly být získány předkem trimastixe a entamoeb nezávisle od blízké příbuzných bakterií. To samé platí pro PFO.

U prokaryot jsou pro vznik aktivních [FeFe]hydrogenáz nezbytné 3 enzymy, maturázy. Mezi eukaryoty byly dosud nalezeny pouze u 5 organismů: *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mastigamoeba balamuthi*, *Acanthamoeba castellanii* a *Andalucia incarcerata* (Hug et al., 2010, Posewitz et al., 2004, Pütz et al., 2006). U *T. pyriformis* byly v transkriptech identifikovány geny pro všechny 3 tyto maturázy hydrogenáz: HydE, HydF a HydG. U HydE a HydF je znám kompletní N-konec s presekvencí. U HydG zatím sekvence N-konce nebyla získána (Hampl et al., 2008, Zubáčová et al., 2013).

### 3.7.2. Další metabolické dráhy potenciálně lokalizované v redukované mitochondrii

#### 3.7.2.1. Katabolismus glycinu

Systém štěpení glycinu (GCS) je metabolická dráha štěpící glycin za vzniku methyltetrahydrofolátu a NADH. Sestává ze 4 enzymů, které pravděpodobně netvoří trvalý komplex, ale mají pouze funkční souvislost. Jsou to tyto enzymy: 1) H-protein s centrální rolí v celé dráze; jeho lipoylová skupina interaguje s ostatními 3 proteiny. 2) P-protein, glycindehydrogenáza provádějící dekarboxylaci. 3) L-protein, dihydrolipoyldehydrogenáza. 4) T-protein, aminomethyltransferáza. U všech dosud studovaných eukaryot je tato dráha lokalizována v matrix mitochondriální organely (Douce et al., 2001).

V transkriptech trimastix byly objeveny geny pro všechny proteiny této dráhy. Proteiny T a L se větví se solidní podporou mezi ostatními eukaryotickými homology, zatímco P-protein je příbuzný obdobnému enzymu z  $\alpha$ -proteobakterií a H-protein se větví, ovšem se slabou podporou, mezi bakteriemi. Bakteriální původ P-proteinu dokládá i fakt, že je stejně jako bakteriální homology a na rozdíl od homologů eukaryotických, exprimován ve formě dvou samostatných podjednotek P1 a P2 (Hampl et al., 2008).

H, P1 a T proteiny trimastix jsou na svém N-konci prodloužené o 14 až 19 aminokyselin ve srovnání s bakteriálními homology (Hampl et al., 2008). Tyto extenze by mohly představovat signální sekvence, například pro import proteinů do mitochondrie.

Serin hydroxymethyltransferáza (SHMT), jejíž sekvence byla též nalezena v EST datech trimastix (Zubáčová et al., 2013), sice není součástí GCS, ale může s touto dráhou být úzce funkčně spojena. Katalyzuje přeměnu serinu a tetrahydrofolátu na glycin a methylenetetrahydrofolát a *vice versa*. Může tedy, ve spojení s GCS, sloužit k odbourávání serinu tím, že jej přemění na glycin a ten je posléze katabolizován enzymy GCS. Sekvence SHMT identifikovaná v transkriptech *T. pyriformis* je na N-konci prodloužená ve srovnání s bakteriálními homology, což může představovat signální sekvenci pro import do mitochondrie (Zubáčová et al., 2013).

#### 3.7.2.2. Katabolismus argininu

Arginin je u některých protist katabolizován tzv. arginin dihydrolázovou dráhou, která sestává ze 3 enzymů: arginin deiminázy (ADI), ornitin transkarbamylázy (OTC) a karbamoyl kinázy (CK). U chytridiomycety *Neocallimastix frontalis* je tato dráha lokalizována v hydrogenosomu (Gelius-Dietrich et al., 2007), na druhou stranu, u *G. intestinalis* se nachází v cytosolu (Touz et al., 2008). ADI nebyla v transkriptech trimastix dosud nalezena, zato OTC a CK ano. Obě sekvence byly identifikovány ve velkém množství EST, což naznačuje velkou míru jejich exprese, dokonce větší než u H-proteinu a SHMT (Zubáčová et al., 2013).

OTC katalyzuje reakci ornitinu s karbamoylfosfátem za vzniku citrulinu. Kromě katabolismu argininu se účastní (u savců) močovinového cyklu. Sekvence nalezená v transkriptech trimastix se zdá být prokaryotického původu, oproti svým prokaryotickým homologům má ale na N-konci extenzi potenciálně sloužící jako signální sekvence. CK z trimastix je též pravděpodobně prokaryotického původu, ale N-terminální sekvence jí chybí (Zubáčová et al., 2013).



### 3.7.2.3. Metabolismus kofaktorů

Lipoyltransferáza je enzym katalyzující první krok lipoylace některých proteinů zapojených do oxidativního metabolismu a metabolismu aminokyselin. Mimo jiných i H-proteinu dráhy GCS (Fujiwara et al., 1997). Všechny dráhy, kterých se tyto proteiny účastní, jsou u eukaryot lokalizovány v mitochondrii nebo plastidu. Homolog lipoyltransferázy nalezený v transkriptech trimastixe se větví se slabou podporou sestersky k sekvenci z hlenky *Dictyostelium* (Hampl et al., 2008).

Pyridin-nukleotid transhydrogenáza (PNT) přenáší ekvivalenty hydridových iontů mezi NAD(H) a NADP(H) a zároveň translokuje protony přes vnitřní mitochondriální membránu, na níž je (u eukaryot) výlučně lokalizována s jedinou známou výjimkou, kterou je *E. histolytica* (Yousuf et al., 2010). Tento enzym funguje ve formě homodimeru, kde každý monomer sestává ze dvou podjednotek –  $\alpha$  a  $\beta$ . Podjednotka  $\beta$  nalezená v transkriptech vykazuje sesterskou pozici se svým homologem z entamoeb. Spolu se větví na bázi ostatních eukaryotických sekvencí, byť se slabou statistickou podporou (Hampl et al., 2008).

### 3.7.2.4. Import a maturace potenciálně mitochondriálních proteinů

Pro funkci mitochondrie je zcela zásadní import proteinů syntetizovaných v cytosolu a jejich následná maturace do funkční konformace. V transkriptech trimastixe byly odhaleny geny pro 3 proteiny umožňující transport proteinů přes mitochondriální membránu: translokázu vnější mitochondriální membrány 40 (Tom40), translokázu vnitřní mitochondriální membrány 17/22/23 (Tim17/22/23) a Pam18, 1 protein umožňující sestavení Tom40 ve vnější membráně: Sam50 a 2 proteiny sloužící k maturaci importovaných proteinů v matrix mitochondrie: chaperonin 60 (Cpn60) a  $\alpha$  podjednotka mitochondriální procesující peptidázy (MPP $\alpha$ ) (Hampl et al., 2008, Zubáčová et al., 2013).

Tom40, se strukturou  $\beta$ -barelu, je esenciální pro transport proteinů přes vnější mitochondriální membránu, ve které je lokalizován, do mezimembránového prostoru. Jedná se o typicky eukaryotickou novinku vzniklou pravděpodobně u společného předka všech dnes žijících eukaryot (Žárský et al., 2012). Sekvence z trimastixe se robustně větví mezi dalšími eukaryotickými homology.

Tim17/22/23 je obdobou Tom40 na vnitřní mitochondriální membráně. Pam18 je součástí motorového komplexu asociovaného s translokázou Tim17/22/23 a zajišťuje posouvání importovaného polypeptidu do matrix mitochondrie. Sam50 je lokalizován na vnější mitochondriální membráně a zajišťuje import Tom40 do této membrány (Kozjak et al., 2003).

Cpn60, označovaný též jako Hsp60, je považován za mitochondriální marker, jelikož má původ v  $\alpha$ -proteobakteriálním předku mitochondrie a u žádného eukaryota dosud nebyl nalezen v jiném buněčném kompartmentu než v matrix mitochondrie, ať už aerobní či redukované anaerobní - hydrogenozom *Trichomonas* a mitozomy rodů *Giardia* a *Entamoeba* (Roger et al., 1996, Tovar et al., 1999, Regoes et al., 2005) a zároveň byl nalezen u všech studovaných eukaryot. Účastní se procesu, při kterém proteiny transportované do mitochondrie z cytosolu nabývají sekundární struktury.

Sekvence Cpn60 nalezená v transkriptech trimastixe se větví se silnou podporou mezi ostatními eukaryotickými homology, ale nejeví specifickou příbuznost žádné konkrétní linii eukaryot. Na N-konci sekvence se nachází extenze, kterou ovšem žádný použitý predikční software nebyl schopen identifikovat jako signální sekvenci (Hampl et al., 2008).

Mitochondriální procesující peptidáza (MPP) je také u eukaryot lokalizována v matrix mitochondrie. Slouží k odštěpování N-terminálních signálních sekvencí z proteinů importovaných do mitochondrie. Tento enzym je obvykle funkční ve formě heterodimeru podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , které hrají při procesingu proteinů různé role (Luciano & Géli, 1996). V transkriptech *T. pyriformis* byla objevena pouze sekvence odpovídající  $\alpha$ -podjednotce. Sekvence se větví sestersky k homologu z trypanosomy v rámci větve ostatních eukaryotických  $\alpha$ -podjednotek MPP (Hampl et al., 2008).

### 3.7.2.5. Mitochondriální přenašeče

V EST datech *T. pyriformis* byly identifikovány 4 sekvence odpovídající proteinům z rodiny mitochondriálních přenašečů. Tyto proteiny obecně zprostředkovávají obousměrný přenos nejrozličnějších menších molekul, například metabolitů, aminokyselin, kofaktorů atd., přes mitochondriální membrány. Mezi eukaryoty ovšem nejsou zcela omezeny na lokalizaci v mitochondriích. Některé byly totiž nalezeny i na membránách peroxizomů a plastidů (Kunji, 2004).

Sekvence mitochondriálního přenašeče 1 (MC1) z transkriptomu trimastixe obsahuje vazebné místo po adeninové nukleoidy, což také odpovídá její fylogenetické pozici, byť slabě statisticky podpořené, mezi přenašeči adeninových nukleotidů jako jsou ATP, NAD, atd (Hampl et al., 2008). Funkce ostatních přenašečů lze odhadovat pouze z jejich fylogenetické pozice. MC2 pravděpodobně přenáší 2-oxodikarboxyláty (Zubáčová et al., 2013). MC3 se větví mezi eukaryotickými přenašeči pyruvátu a folátu (Hampl et al., 2008). Funkce MC4 se nepodařilo z jeho sekvence předpovědět (Zubáčová et al., 2013).

## 3.8. Dosavadní znalosti o potenciální mitochondriální organele

V transkriptech trimastixe bylo dosud identifikováno 15 genů, jejichž produkty jsou mezi eukaryoty lokalizovány výlučně v mitochondrii. Jedná se o tyto proteiny: akonitáza, H-protein (GCS), P1-protein (GCS), P2-protein (GCS), L-protein (GCS), T-protein (GCS), lipoyltransferáza, PNT $\alpha$ , PNT $\beta$ , Tom40, Tim17/22/23, Sam50, Pam18, MPP $\alpha$  a Cpn60.

Z těchto 15 proteinů má 5 (Akonitáza, H-protein, P1-protein, T-protein, Cpn60) na N-konci extenzi, která může být signální sekvencí pro import do mitochondrie. Žádná z těchto sekvencí ale nebyla coby signální sekvence rozpoznána predikčním softwarem.

Potenciální signální sekvence byly identifikovány u dalších 4 genů, jejichž produkty byly u ostatních eukaryot nalezeny v mitochondrii, ale i mimo ni, a sice u HydE, HydF, SHMT a OTC.

U dalších alespoň 8 genů existuje důvod se domnívat, že jejich produkty mohou mít mitochondriální lokalizaci, ale buď nemají žádnou N-terminální extenzi, nebo u nich N-konec není znám. Mezi tyto geny patří: HydG, hydrogenázy 1 až 3 a MC1 až MC4.

Celkem tedy víme o 27 genech, na které má smysl se zaměřit při našem pátrání po přítomnosti či nepřítomnosti mitochondriální organely v buňce trimastixe, případně po fyziologických funkcích této organely. Některé z těchto genů už svou prostou přítomností v genomu trimastixe naznačují, že tento organizmus nějaký typ mitochondrie má, či v minulosti měl. Jsou to zejména geny pro proteiny zajišťující import polypeptidů do mitochondrie a jejich maturaci. Již na základě jejich přítomnosti lze tvrdit, že *T. pyriformis* měl mitochondriálního předka a jeho potenciální amitochondrialita by tedy byla sekundární.

Pro další úvahy o fyziologických funkcích mitochondriální organely je zásadní otázka, zda má nějakou úlohu v energetickém metabolismu. Z ultrastrukturních studií víme, že podezřelé organely nalezené v buňce trimastixe a potenciálně představující redukované mitochondrie nejvíce připomínají hydrogenozomy. S tím by souhlasila zjištěná přítomnost hydrogenáz v transkriptomu trimastixe. Z pouhých sekvencí jejich genů ovšem nemůžeme odvodit nic o jejich lokalizaci v buňce. Je tedy možné, že jsou aktivní v cytosolu, stejně jako u protist s mitozomy. Na druhou stranu, dvě ze tří sekvencí maturáz hydrogenáz obsahují N-terminální extenzi. Pokud by tato extenze byla signálem pro import maturáz do mitochondriální organely, bylo by pravděpodobné, že jsou do ní importovány i samotné hydrogenázy.

Zarážející je, že v transkriptech *T. pyriformis* nebyly identifikovány ani náznaky přítomnosti genů pro mitochondriální systém syntézy železosírných center ISC. Syntéza FeS center je totiž všeobecně považována za jedinou známou esenciální funkci mitochondrie, která je přítomna i v těch nejredukovanějších variantách této organely, mitozomech.

Takové jsou tedy dosavadní výsledky 2 transkriptomických studií provedených na *T. pyriformis* a zaměřených na potenciálně mitochondriální geny. Neříkají nic jiného, než že se dané geny pravděpodobně v genomu trimastixe nacházejí. Je třeba mít také na paměti, že vždy může jít o bakteriální kontaminaci, jelikož se dosud nepodařilo kultivovat tohoto prvoka v axenické kultuře bez živých bakterií. Určitou jistotu můžeme mít pouze u genů, které jeví solidně podpořenou specifickou příbuznost svým eukaryotickým homologům, ideálně z „říše“ Excavata, nebo u takových, které byly nalezeny ve velkém množství transkriptů, což by v případě jejich původu z bakteriální kontaminace bylo velmi nepravděpodobné.

O přítomnosti těchto genů v genomu trimastixe tedy nemůžeme definitivně rozhodnout čistě na základě sekvenčních dat a je nutné provést laboratorní experimenty, které jejich přítomnost potvrdí či vyvrátí. Zda se dané geny nacházejí v genomu trimastixe a ne bakterií, se kterými sdílí kulturu, může rozhodnout metoda FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace. O lokalizaci jejich proteinových produktů v buňce nám pak poskytnou informace různé imunocytologické metody, jako imunofluorescenční mikroskopie, imunoelektronová mikroskopie, nebo Western Blot.

U některých zmíněných genů je uvedeno, že obsahují podezřelou N-terminální extenzi, která může představovat signální sekvenci pro import do mitochondriální organely. Většina z těchto sekvencí nebyla rozpoznána predikčním softwarem. To se ovšem u málo studovaných skupin, jakými *Preaxostyla* bezpochyby jsou, dá předpokládat. Relativně snadným způsobem, jak ověřit, zda skutečně jde o signální sekvence, je sledovat, zda budou jako takové rozpoznány buňkou jiného eukaryotického organismu. Za tím účelem je možné vnést do buňky modelového organismu, například kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, rekombinantní gen obsahující co nejdelší část genu

původem z trimastixe včetně N-konce a fluorescenční značku. Následná fluorescenční mikroskopie úspěšně transformovaných buněk barvených fluorescenční značkou rozpoznávající mitochondrie ukáže, zda signál rekombinantního proteinu kolokalizuje se signálem značícím mitochondrie či nikoliv.

Fakt, že některé sekvence N-terminální extenzi nemají, nemusí znamenat, že nemohou být importovány do mitochondriální organely. Signální sekvence se totiž může nacházet i uvnitř genu (Mentel et al., 2008).

### **3.9. Redukované mitochondrie některých dalších studovaných protist**

Silně redukované mitochondriální organely, potenciálně podobné těm v buňce trimastixe, můžeme najít i u organismů, které jsou daleko lépe prostudovány, zejména z důvodů svého významu coby patogenů člověka nebo hospodářských zvířat. V následujících kapitolách jsou stručně shrnuty výsledky proteomických studií (v kontextu studií genomických) mitochondriálních organel 3 významných patogenů člověka: parabazilida *Trichomonas vaginalis*, diplomonády *Giardia intestinalis* a améby *Entamoeba histolytica*.

#### **3.9.1. Proteom hydrogenozomu *Trichomonas vaginalis***

Bičenka poševní, *T. vaginalis* je parazitický prvok patřící do taxonu Parabasalia v rámci skupiny Metamonada, jedné ze dvou linií „říše“ Excavata. Je tedy relativně blízce příbuzná trimastixovi, přestože podstatně vzdálenější než oxymonády. Mitochondriální organely nacházející se v buňce *T. vaginalis* se nazývají hydrogenozomy a jsou pravděpodobně nejlépe prostudovanými redukovanými mitochondriemi vůbec. Jako hydrogenozomy se označují i další organely u jiných skupin eukaryot, například u některých chytridiomycet (Yarlett et al., 1986) nebo nálevníků (Yarlett et al., 1984), ale i u mnohobuněčných živočichů korzetek (Danovero et al., 2010). Je pravděpodobné, že tyto organely vznikly mnohokrát nezávisle na sobě reduktivní evolucí typické aerobní mitochondrie. Pro všechny hydrogenozomy je charakteristické, že se, ač jsou anaerobní, podílejí na energetickém metabolismu buňky produkcí ATP díky reakci, která přeměňuje pyruvát na acetát za vzniku molekulárního vodíku.

O proteinech aktivních v hydrogenozomu *T. vaginalis* máme dobrou představu jednak díky tomu, že je znám kompletní jaderný genom tohoto prvoka (Carlton et al., 2007), ale především díky rozsáhlé proteomické studii zaměřené specificky na hydrogenozomy (Schneider et al., 2011).

Tato studie identifikovala 569 proteinů potenciálně lokalizovaných v hydrogenozomu. Je ovšem třeba mít na paměti, že separační metody, užitě k získání vzorků obohacených o hydrogenozomy, nejsou ani zdaleka dokonalé a mnoho z identifikovaných proteinů může představovat kontaminace z jiných buněčných kompartmentů, nebo proteiny asociované s vnějším povrchem hydrogenozomu (Schneider et al., 2011).

Z těchto proteinů lze 175 přiřadit k metabolickým drahám, které byly již dříve rozpoznány jako hydrogenozomální. Jde především o energetický metabolismus, syntézu železosirných komplexů, odpověď na oxidační stres, metabolismus aminokyselin a import a maturaci proteinů syntetizovaných v cytosolu. Dalších 101 proteinů se zdá být unikátní pro genom *T. vaginalis* a z toho důvodu je obtížné odhadovat jejich funkci na základě sekvencí. Jako jednoznačné

kontaminace bylo identifikováno 33 proteinů. Proteom hydrogenozomů *T. vaginalis* se zdá být silně redundantní (Schneider et al., 2011), což je ostatně obecná vlastnost genomu tohoto organismu. Dobře to ilustruje například 15 paralogů malátdehydrogenázy, z nichž 7 bylo identifikováno i v proteomu hydrogenozomu. I mnohé další proteiny jsou kódovány velkým množstvím paralogních genů. Pro úvahy o funkci hydrogenozomu mají zvláštní význam enzymy hydrogenázy, které jsou klíčovými články energetického metabolismu. Těch se v hydrogenozomálním proteomu nachází 5 (Schneider et al., 2011).

Zhruba jednu třetinu proteinů z hydrogenozomálního proteomu lze zařadit do těchto funkčních kategorií: metabolismus sacharidů (44 proteinů), energetický metabolismus (36), metabolismus aminokyselin (22), přenos proteinů přes membrány (14), chaperoninové funkce (12), flavin-dependentní katalýza (11), reakce na oxidační stres (9), syntéza Fe-S center (8), hydrolýza ATP (8), pepidázové funkce (6) a další (Schneider et al., 2011).

Pomocí bioinformatických analýz bylo identifikováno 89 proteinů z proteomu hydrogenozomu, které by mohly být transmembránovými proteiny (Schneider et al., 2011). Toto číslo je ovšem pravděpodobně nereprezentativní, neboť transmembránové proteiny se v proteomických studiích obtížně identifikují. Jejich skutečný počet tedy pravděpodobně bude vyšší.

### **3.9.1.1. Energetický metabolismus**

V proteomu byly identifikovány všechny proteiny, které byly již dříve považovány za složky energetického metabolismu, některé z nich ve více paralogích. Jde o tyto proteiny: malátdehydrogenáza, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), ferredoxin (Fdx), sukcinátthiokináza (SCS), adenylátkináza (AK), [FeFe]hydrogenázy (Hyd), acetyl:sukcinát CoA-transferáza (ASCT), podjednotky nikotinamid adenin dinukleotid dehydrogenázy Ndh51 a Ndh24 (Schneider et al., 2011).

### **3.9.1.2. Reakce na oxidační stres**

Některé enzymy energetického metabolismu, například PFO nebo hydrogenázy, jsou velmi citlivé na inhibici kyslíkem (Hrdý & Müller, 1995). V genomu *T. vaginalis* bylo objeveno 7 paralogů kódujících superoxid dismutázu (Carlton et al., 2007), enzym, který přeměňuje reaktivní superoxidový anion na peroxid vodíku. Dva z těchto paralogů byly nalezeny i v proteomu hydrogenozomu (Schneider et al., 2011). Peroxid vodíku je dále metabolizován za vzniku vody tzv. thioredoxinovou drahou (TRX) a peroxidázou rubrerythrinem (Rbr). V proteomu byly identifikovány 2 ze 3 proteinů TRX dráhy: Trx a TrxP a také Rbr. Dále byly v proteomu nalezeny dva proteiny, které jsou podezřelé, že se u bakterií také podílejí na metabolismu peroxidu vodíku: OsmC/Ohr hydroperoxidáza a „hybrid cluster protein“ (HCP). Další reaktivní forma kyslíku, molekulární O<sub>2</sub>, může být metabolizována proteinem hydrogenozomální reduktáza kyslíku (Hor), taktéž přítomným v proteomu hydrogenozomu (Schneider et al., 2011).

### **3.9.1.3. Syntéza FeS center**

Existuje domněnka, že syntéza železosírných center je jedinou skutečně esenciální funkcí všech mitochondriálních organel (Lill et al., 2006). Pro nutnost přítomnosti této metabolické dráhy v hydrogenozomu *T. vaginalis* hovoří i fakt, že mnohé enzymy účastníci se energetického

metabolismu této organely vyžadují pro svou funkci FeS centra coby kofaktory. V genomu *T. vaginalis* bylo identifikováno 12 genů kódujících proteiny typické mitochondriální dráhy syntézy FeS center, označované jako ISC (Carlton et al., 2007). Z těchto proteinů bylo 8 nalezeno i v proteomu hydrogenozomu: IscU, IscA, IscS, Fdx, Hsp20, GrpE, HydF a HydG (Schneider et al., 2011). Ze zbývajících 3 byly 2, frataxin a HydE, lokalizovány v hydrogenozomu jinými metodami (Doležal et al., 2007; Putz et al., 2006).

#### **3.9.1.4. Metabolismus aminokyselin**

Některé enzymy metabolismu aminokyselin nalezené v proteomu *T. vaginalis* mohou mít funkční souvislost se syntézou FeS center. Fosfoserin aminotransferáza (PSAT), metionin- $\gamma$ -lyáza (MGL) a cystein syntáza (CS) se totiž podílejí na konverzi fosfohydroxypyruvátu a homocysteinu na cystein. Cystein je následně desulfurován enzymem IscS za vzniku alaninu, který může být dále konvertován na glutamát prostřednictvím alanin aminotransferázy (ALT), která byla v hydrogenozomálním proteomu identifikována ve 4 kopiích (Schneider et al., 2011).

Z dráhy štěpení glycinu (GCS) byly v proteomu hydrogenozómu nalezeny 2 enzymy: H- a L- proteiny (Mukherjee et al., 2006) a stejně tak serin hydroxymetyltransferáza (SHMT), která s nimi může být funkčně propojená. Dále byly v proteomu identifikovány aspartát aminotransferáza (AAT) a glutamát dehydrogenáza (GDH) (Schneider et al., 2011).

V hydrogenozomu *T. vaginalis* se tedy nacházejí proteiny zapojené do metabolismu 6 aminokyselin: Ala, Asp, Cys, Glu, Gly a Ser. Metabolismus aminokyselin tedy lze považovat za jednu ze zásadních funkcí této redukované mitochondrie. Na druhou stranu, lidská mitochondrie se účastní metabolismu alespoň 17 aminokyselin (Guda et al., 2007).

#### **3.9.1.5. Transport proteinů do hydrogenozomu**

Výsledky proteomické studie naznačují, že translokázový komplex na membránách hydrogenozomu *T. vaginalis* je značně odlišný od toho známého z aerobních mitochondrií. V proteomu byly nalezeny pouze 4 proteiny, které by mohly představovat součásti komplexu TOM, neboť obsahují doménu porin-3 typickou pro Tom40 (Schneider et al., 2011). Další studie našla hned 8 sekvencí odpovídajících struktuře  $\beta$ -barelu a 6 z nich identifikovala jako homology Tom40 (Rada et al., 2011). Další komponenta typických translokázových komplexů na vnější membráně identifikovaná v hydrogenozomálním proteomu je Sam50, tedy protein, který mj. umožňuje integraci Tom40 do membrány (Schneider et al., 2011, Rada et al., 2011). Dále se v proteomu nacházejí  $\beta$ -barelové proteiny s některými charakteristikami translokázových pórů (Dyall et al., 2003), konkrétně jde o 4 proteiny podobné Hmp35/Hmp36, z nichž alespoň jeden by mohl představovat transportér kovových iontů (Rada et al., 2011).

Schneider et al. (2011) v hydrogenozomálním proteomu nedokázali identifikovat žádné zástupce tzv. malých TIMů, rozpustných proteinů, které přenášejí importované proteiny přes mezimembránový prostor. Rada et al. (2011) objevil 2 sekvence silně modifikovaných malých TIMů, Tim9/10a a Tim9/10b.

Z proteinů translokázových komplexů vnitřní membrány byly v hydrogenozomálním proteomu nalezeny proteiny sekvencně podobné rodině Tim17/22/23 (Schneider et al., 2011), která se

podílejí na obou komplexech TIM (komplex TIM23 zajišťuje import proteinů do matrix mitochondrie a TIM22 do vnitřní mitochondriální membrány). Jejich sekvence jsou ovšem příliš odlišné od známých příkladů, takže není možné identifikovat, kterou konkrétní podjednotku představují (Rada et al., 2011). Schneider et al. (2011) dále identifikovali Tim44, asociovaný s TIM23, a Pam 16 a Pam18, které tvoří součásti komplexu PAM také asociovaného s TIM23. Rada et al. (2011) potvrdili hydrogenozomální lokalizaci jak Tim44, tak Pam16 a Pam18 imunofluorescenčním značením.

### 3.9.1.6. Mitochondriální přenašeče

Z rodiny mitochondriálních přenašečů (MCF), které přenášejí nejrůznější menší molekuly přes mitochondriální membrány, bylo v proteomu hydrogenozomu *T. vaginalis* nalezeno 6 proteinů (Schneider et al., 2011). Rada et al. (2011) nalézají u 5 hydrogenozomálních členů MCF sekvenční podobnost s Hmp31, který zajišťuje transport ATP a ADP.

### 3.9.2. Proteom mitozomu *Giardia intestinalis*

Střevní parazitická diplomonáda *G. intestinalis* se řadí do taxonu Fornicata v rámci skupiny Metamonada v „říši“ Excavata. Je blíže příbuzná *T. vaginalis* než *T. pyriformis*. V její buňce se nacházejí extrémně redukované mitochondriální organely nazývané mitozomy, které podle současných vědomostí nemají žádnou úlohu v energetickém metabolismu. Podobné, ač jistě nezávisle vzniklé, organely najdeme i v řadě jiných nepříbuzných eukaryot, například lobózní amébě *Entamoeba histolytica* (viz níže), mikrosporidiích nebo apikomplexanovi *Cryptosporidium* (Katinka et al., 2001, Riordan et al., 1999).

V proteomu mitozomu *G. intestinalis* bylo identifikováno pouhých 139 proteinů a u 20 z nich byla mitozomální lokalizace podpořena experimentálně. Z výsledku proteomické studie vyplývá pouze jediná fyziologická funkce mitozomu, a sice syntéza železosírných center (Jedelský et al, 2011).

#### 3.9.2.1. Syntéza FeS center

V proteomu hydrogenozomu *G. intestinalis* byly odhaleny proteiny IscS, IscU a Nfu, které se podílejí na syntéze přechodných FeS center, stejně jako některé proteiny účastníci se přenosu těchto přechodných center na cílové apoproteiny: IscA, glutaredoxin 5, Hsp70, HscB a GrpE (Jedelský et al, 2011).

Překvapující je, že v proteomu mitozomu, ani v kompletním genomu *G. intestinalis*, nebyl nalezen ani náznak přítomnosti frataxinu, enzymu který je spojen s ISC mašinerií u všech studovaných eukaryot (Jedelský et al, 2011). Byl nalezen i v jiných prvocích s mitozomy, mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi*, apikomplexanovi *Cryptosporidium parvum* i diplomonádě *Spironucleus vortens* (Goldberg et al., 2008, Abrahamsen et al., 2004, Millet et al, 2013).

V mitozomálním proteomu také nebyly nalezeny proteiny Ind1 a Iba57 (Jedelský et al, 2011), které se u aerobních mitochondrií podílejí na syntéze FeS center pro proteiny respiračního komplexu I a jsou přítomné i v hydrogenozomu *T. vaginalis*, který obsahuje pozůstatky komplexu I. Nepřítomnost těchto proteinů v mitozomu je konzistentní s kompletní ztrátou proteinů respiračních komplexů u této organely.

Metabolická dráha ISC vyžaduje pro svoji funkci přenos redukujících ekvivalentů, který je u jiných mitochondriálních organel zajišťován krátkým elektrontransportním řetězcem (Mühlenhoff et al, 2002) sestávajícím ze 2 proteinů: [2Fe2S]ferredoxinu a ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reduktázy (FNR). Ferredoxin byl identifikován i v proteomu mitozomu *G. intestinalis*, na rozdíl od FNR, kterou se nalézt nepodařilo (Jedelský et al, 2011).

Dalším proteinem s redoxní funkcí nalezeným v mitozomálním proteomu je GiOR-1, který pravděpodobně neslouží jako reduktáza ferredoxinu, ale má schopnost využívat NADPH jako donor elektronů (Jedelský et al, 2011). To naznačuje úlohu pyridinových nukleotidů v elektronovém transportu v mitozomech *G. intestinalis*.

### **3.9.2.2. Transport a maturace proteinů**

V proteomu byl nalezen jeden homolog translokázy přes vnější membránu Tom40, ale ne žádné další asociované proteiny komplexu TOM, ani žádné proteiny komplexu SAM (např. Sam50), který slouží k integraci Tom40 do vnější membrány (Jedelský et al, 2011).

Z proteinů komplexů na vnitřní membráně byly nalezeny pouze proteiny Pam16 a Pam18 a s nimi asociovaný Hsp70 (Jedelský et al, 2011). Nepřítomnost komponent komplexů TIM, zejména proteinů z rodiny Tim17/22/23 je zarážející, neboť proteiny lokalizované v matrix mitozomu musejí být nějakým způsobem přes vnitřní membránu přenášeny.

Proteiny čerstvě importované do mitochondrie nabývají správné konformace díky pomoci chaperonů Cpn10 a Cpn60, které tvoří komplex lokalizovaný v matrix mitochondrie. Oba tyto proteiny byly identifikovány v proteomu mitozomu *G. Intestinalis* (Jedelský et al, 2011).

### **3.9.3. Proteom mitozomu *Entamoeba histolytica***

Střevní měňavka *Entamoeba histolytica* se řadí mezi archaméby v rámci skupiny Conosa v eukaryotické „říši“ Amoebozoa. Je tedy velmi pravděpodobně blíže příbuzná živočichům a houbám, než organismům z „říše“ Excavata, kam patří *T. pyriformis*, *T. vaginalis* i *G. intestinalis*. V její buňce nalezneme extrémně redukované mitochondrie, které se, stejně jako u *G. intestinalis* etc., nazývají mitozomy.

Proteom mitozomu entamoebly se zdá být ještě redukovanější než u *G. intestinalis*. Bylo v něm totiž identifikováno pouhých 95 proteinů. Je ovšem pravděpodobné, že tato studie (Mi-Ichi et al., 2009) neodhalila všechny proteiny lokalizované v mitozomu. Mezi těmito 95 sekvencemi byly identifikovány jako dominantní, tedy nejčastější, 3 enzymy zapojené do aktivace sulfátu (Mi-Ichi et al., 2009).

#### **3.9.3.1. Syntéza FeS center**

*E. histolytica* patrně v průběhu evoluce zcela ztratila typický mitochondriální systém syntézy FeS center ISC. Žádný z genů kódujících proteiny tohoto systému se nepodařilo nalézt, přestože je k dispozici kompletní genom entamoebly. ISC je u tohoto organismu zřejmě nahrazen bakteriálním systémem NIF získaným laterálním genovým přenosem z  $\epsilon$ -proteobakterií. V genomu *E. histolytica* byly nalezeny 2 proteiny této dráhy, NifS a NifU. Jak ukázaly experimenty s *E. coli* s deletovanými



geny pro ISC i SUF systémy, tyto 2 proteiny jsou samy o sobě schopné zastat funkci systému syntézy FeS center za anaerobních podmínek (Ali et al., 2004). Proteomická studie nezjistila lokalizaci těchto proteinů v mitozomu *E. histolytica* (Mi-Ichi et al., 2009), autoři sami ale varují před neúplností proteomu. Imunologické lokalizační metody odhalily dvojí lokalizaci obou proteinů jak v cytosolu, tak v mitozomech, přičemž v mitozomech jsou oba proteiny 10x koncentrovanější, než v cytosolu (Maralikova et al., 2010). Mitozomy *E. histolytica* tedy možná obsahují funkční dráhu syntézy FeS center stejně, jako všechny dosud studované mitochondriální organely. Je to ovšem dráha zcela odlišná. Proteiny NifS a NifU byly nalezeny i v transkriptomu jiné archaméby, *Mastigamoeba balamuthii*, která je *E. histolytica* blíže příbuzná (Gill et al., 2007). Zde existují přesvědčivé doklady o dvojí lokalizaci NIF systému jak v cytosolu, tak v mitozomech (Nývltová et al., 2013).

### **3.9.3.2. Dráha aktivace sulfátu**

Enzymy účastníci se aktivace sulfátu jsou u eukaryot lokalizovány buď v cytosolu nebo v plastidech (Patron et al., 2008). Kromě *E. histolytica* a *M. balamuthii* nebyly dosud u žádného eukaryotického organismu nalezeny v mitochondriální organelle. V proteomu mitozomu *E. histolytica* byly nalezeny všechny 3 enzymy typické pro dráhu aktivace sulfátu: ATP sulfuryláza (AS), APS kináza (APSK) i anorganická pyrofosfatáza (IPP) (Mi-Ichi et al., 2009). Sekvence kódující tyto enzymy byly identifikovány i v transkriptomu *M. balamuthii* (Gill et al., 2007). U *E. histolytica* má aktivovaný sulfát produkovaný enzymy v mitozomu úlohu především při syntéze sulfolipidů (Mi-Ichi et al., 2011).

### **3.9.3.3. Transport a maturace proteinů**

V proteomu mitozomu *E. histolytica* byly nalezeny homology dvou proteinů translokázových komplexů: Tom40 a Hsp70 (Mi-Ichi et al., 2009). Mitozomální lokalizace Sam50, identifikovaného v genomu *E. histolytica*, byla potvrzena jinými metodami (Doležal et al., 2010). Dále byly v proteomu identifikovány proteiny Cpn10 a Cpn60, typické mitochondriální markery, které slouží k maturaci proteinů importovaných do matrix mitochondrie (Mi-Ichi et al., 2009).

#### 4. Cíle práce

- 1) Pokusit se identifikovat nové potenciální mitochondriální geny v nově získaných transkriptech *T. pyriformis*.
- 2) Vytvořit protilátky proti vybraným potenciálně mitochondriálním proteinům a ověřit lokalizaci těchto proteinů v buňce *T. pyriformis*.
- 3) Ověřit, zda jsou modelovými organizmy rozpoznávány signální sekvence vybraných potenciálně mitochondriálních proteinů *T. pyriformis*.

## 5. Metody

### 5.1. Kultivace a práce s buňkami *T. pyriformis*

#### 5.1.1. Příprava média ATCC 802

Použité chemikálie:

- Cerophyll (Cereal Grass Media, ScholAR Chemistry, 9448604): 2,5 g,
- Destilovaná voda: 1000 ml,
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, 129K0053): 0,5 g.

2,5 g Cerophyllu jsme přidali do 1000 ml vody a vařili 5 minut. Poté jsme přidali 0,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 100 ml vody na doplnění odpařeného objemu. Směs jsme přefiltrovali přes filtrační papír a vysterilizovali autoklávováním 20 minut při 121 °C. Hotové médium jsme uchovávali v lednici při 4 °C ve skleněných lahvích, případně rozplněné do plastových zkumavek,

#### 5.1.2. Příprava média 100% LB, 3% LB a LB agaru

Pro přípravu 1 l 100% média LB jsme použili:

- LB Broth (Sigma, L3022): 20 g,
- Destilovaná voda: 1000 ml.

LB Broth jsme přidali do vody a promíchali. Směs jsme sterilizovali autoklávováním 20 minut při 121 °C. Výsledné médium má složení:

- trypton: 10 g/l,
- extrakt z kvasinek: 5 g/l,
- NaCl: 5 g/l.

Hotové médium jsme uchovávali ve skleněných lahvích v lednici při 4 °C.

Pro přípravu 1 l 3% LB jsme přidali 30 ml hotového 100% LB do 1000 ml vody. Médium jsme připravovali vždy čerstvě bezprostředně před použitím.

Pro přípravu 1 l LB média s agarem jsme do 1000 ml 100% LB média přidali 15 g agaru a směs vyklávovali 20 minut při 121 °C. Po částečném vychladnutí jsme LB agar nalili do sterilních plastových Petriho misek (cca 20 ml do 1 misky) a nechali utuhnout v laminárním boxu.

#### 5.1.3. Kultivace *T. pyriformis*

*Trimastix* byl kultivován v polyxenické kultuře s příměsí blíže nedefinované směsi bakterií v médiu ATCC 802 při pokojové teplotě. Bakterie byly naočkovány do média 1 den před inokulací trimastixe, nebo jsme zkumavky s naočkovanými bakteriemi uchovávali v lednici při 4 °C.

Pro běžnou dlouhodobou kultivaci jsme inokulovali jednou týdně přibližně 5x10<sup>5</sup> buněk do 10 ml média s bakteriemi v 15ml plastových zkumavkách a kultivovali s utaženým víčkem.

Pro získání většího objemu kultury trimastixe jsme inokulovali  $5 \times 10^5$  buněk do 45 ml média s bakteriemi v 50ml plastové zkumavce a kultivovali s utaženým víčkem 3 až 4 dny. Celý objem této kultury jsme následně přenesli do 1000 ml média s bakteriemi ve skleněné lahvi a kultivovali s utaženým víčkem.

#### 5.1.4. Filtrace kultury s *T. pyriformis*

V zájmu minimalizace bakteriální kontaminace jsme před izolací genomové DNA, RNA nebo proteinů a před přípravou vzorků trimastixe pro imunofluorescenční mikroskopii, provedli filtraci kultury. V prvním kroku jsme kulturu filtrovali přes filtrační papír, abychom odstranili velké shluky bakterií. Zbývajících bakterií jsme se poté zbavili filtrací přes filtry Whatman s  $3 \mu\text{m}$  póry a s průměrem 47 mm. Na jeden filtr jsme nanášeli maximálně 250 ml kultury. Buňky trimastixe zadržené nad filtrem jsme poté dvakrát promyli 250 ml 3% médiem LB o pokojové teplotě. Filtraci přes filtry Whatman a následné promývání bylo třeba provést co nejrychleji, jelikož *Trimastix* při přílišném vystavení vzdušnému kyslíku hyne. Proto jsme během filtrace i promývání médium s buňkami trimastixe permanentně vířili pomocí plastových Pasteurových pipet, aby se urychlilo protékání média s bakteriemi skrze filtr. Posledních několik ml média nad filtrem jsme po druhém promytí přenesli do plastové zkumavky a uchovávali na ledu pro další použití. Mezi jednotlivými kroky jsme médium obsahující trimastixe kontrolovali pomocí světelného mikroskopu.

#### 5.1.5. Příprava poly-L-lysinovaných sklíček

Poly-L-lysin (Sigma-Aldrich, P8920) jsme naředili destilovanou vodou v poměru 1:10 a vzniklý roztok jsme nalili do plastové nádoby. Na 15 minut jsme do směsi ponořili krycí sklíčka. Poté jsme sklíčka vyjmuli, nechali okapat a dali schnout přes noc při pokojové teplotě.

#### 5.1.6. Paraformaldehydová fixace buněk *T. pyriformis* pro imunofluorescenční mikroskopii

Použité chemikálie:

- Paraformaldehyd
- PEM pufr
  - 0.1 M PIPES - Kyselina piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová) (P6757),
  - 2 mM EGTA - kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetracetová (Amresco, 0732),
  - 1 mM  $\text{MgSO}_4$ .
- Blokovací roztok PEMBALG
  - 1x PEM pufr,
  - 0,5% rybí želatina (Sigma)
  - 1% BSA (hovězí sérový albumin, Sigma),
  - 100mM lysin (Sigma),
  - 0,1% azid sodný,
- Primární protilátky
  - Anti-GCSH pAb (Abnova, H00002653-A01)
  - Anti-TpGCSH (vlastní příprava imunizací potkana, viz kapitola 5.4.5)

- Sekundární protilátky
  - Anti-mouse IgG (Sigma, 079K6034)
  - Anti-Rat IgG (Sigma, 070M6110)
- Hoechst 33258, zásobní roztok 25 mg/10ml (Sigma-Aldrich, 861405)
- Montážní roztok Vectashield Mounting Medium (Vector laboratories, H-1000)

Postup:

Buňky *T. pyriformis* v médiu po filtraci jsme fixovali paraformaldehydem o konečné koncentraci 1 % po 30 minut při pokojové teplotě. Poté jsme je nanесли na polylysinovaná krycí sklíčka a ponechali jsme je adherovat 1 hodinu. Preparáty jsme osušili a potom permeabilizovali 10 minut 0,1% tritonem v 1x PEM pufru. Sklíčka jsme promyli 3 x 0,5 minuty puftrem 1x PEM a následně blokovali roztokem PEMBALG 30 minut při pokojové teplotě. Preparáty jsme inkubovali s primárními protilátkami naředěnými 1:200 přes noc na plátku parafilmu při 4 °C a potom 3x promyli puftrem 1x PEM po dobu 5, 10 a 15 minut. Následovala inkubace preparátů se sekundárními protilátkami naředěnými 1:1000 po 1 hodinu na plátku parafilmu při pokojové teplotě. Preparáty jsme dvakrát promyli puftrem PEM po dobu 5 a 10 minut a potřetí 15 minut puftrem PEM s přidanou barvou Hoechst 33342 naředěnou 1:1000 a nakonec je montovali do montážního média Vectashield. Preparáty jsme uchovávali ve tmě, dokud jsme je neprohliželi fluorescenčním mikroskopem IX81 s kamerou IX2-UCB a softwarem Cell<sup>^</sup>R.

### 5.1.7. Jednoduchá frakcionace *T. pyriformis*

Tuto metodu jsme používali, abychom odlišili cytosolické proteiny od proteinů lokalizovaných v potenciální mitochondriální organele. Médium obsahující buňky trimastixie jsme po přefiltrování centrifugovali 10 minut při 1000 x g a 4 °C. Následovala sonikace 1 až 2 minuty s amplitudou 40 a délkou pulzů 1 sekund. Sonikát jsme průběžně kontrolovali pomocí světelného mikroskopu. Takto získaný lyzát jsme centrifugovali 10 minut při 500 g a 4 °C. Supernatant jsme odebrali a přemístili do nové zkumavky. Pelet jsme resuspendovali v 1x I pufru a povařili 5 minut. Supernatant jsme centrifugovali 40 minut při 100000 g a 4 °C. Supernatant po této centrifugaci (cytosolická frakce) jsme přemístili do nové mikrozkušavky, centrifugovali ještě jednou za stejných podmínek, a povařili s 5x I puftrem 5 minut. Pelet (organelová frakce) jsme resuspendovali v 1x I a také povařili 5 minut. Vzorokly jsme přechovávali v -80 °C a analyzovali SDS PAGE a následným imunoblotem.

## 5.2. Kultivace a práce se *Saccharomyces cerevisiae*

### 5.2.1. Příprava média YPD a ploten YPD a (-)URA pro kultivaci *S. cerevisiae*

- Základní médium YPD
  - destilovaná voda: 500 ml,
  - D-glukóza (Penta, 210304FE): 10 g,
  - extrakt z kvasinek (Oxoid, LP0021): 5 g,
  - pepton (Trypticase peptone BBL): 10 g.

Pro přípravu YPD agaru jsme k výše uvedené směsi YPD přidali 6 g agaru a vyklávovali 20 minut při 121°C. Částečně vychladlé médium jsme nalévali na sterilní plastové Petriho misky a nechali utuhnout v laminárním boxu pod UV zářením.

- (-)URA agar
  - D-glukóza: 10 g,
  - yeast nitrose base: 3,35 g,
  - drop out (-) URA (Clontech, 630416),
  - dH<sub>2</sub>O: 500 ml,
  - agar: 6 g.

### 5.2.2. Kultivace *S. cerevisiae* YPH499 (ATCC: 204679)

Netransformované kvasinky *S. cerevisiae* jsme kultivovali na YPD plotnách. Nechali jsme je narůst po 1 až 3 dny ve 30 °C a poté uchovávali v pokojové teplotě. Pro transformaci jsme kvasinky naočkovali do 5 ml tekutého média YPD a kultivovali přes noc na třepačce při 30 °C a 150 otáčkách za minutu.

### 5.2.3. Příprava vektorů pro transfekci kvasinek

Použité chemikálie:

- LB agar (příprava viz výše)
- 100% LB médium (příprava viz výše)
- Ampicilin (100 µg/ml)
- Kanamycin (50 µg/ml)
- SOC médium
  - trypton: 20 g,
  - extrakt z kvasinek: 5 g,
  - NaCl: 0,5 g,
  - KCl: 0,186 g,
  - MgCl<sub>2</sub>: 0,952 g,
  - MgSO<sub>4</sub>: 2,408 g,
  - glukóza: 3,603 g,
  - Doplněno destilovanou H<sub>2</sub>O na 1 l.
- 0,1 M IPTG (Fermentas, R0392)
- X-Gal
  - 5-bromo-4chloro-3-indoyl-β-D-galactosid: 100 mg,
  - N,N'- dimethylformamid: 2 ml.

Postup:

Požadovaný úsek DNA jsme amplifikovali pomocí PCR mastermixu PrimeSTAR Max Premix 2x (TaKaRa) se specifickými primery obsahujícími restriční místa. Produkty PCR jsme pomocí agarózové elektroforézy rozdělili podle délky a požadovaný úsek jsme vyřízli a přečistili pomocí Zymoclean Gel DNA recovery kitu. Tato získanou DNA jsme zaligovali do plazmidu pJET 1.2 pomocí

CloneJET PCR Cloning kitu (Thermo scientific, K1231). Ligační směsí jsme transformovali kompetentní buňky *E. coli* TOP10, případně XL1, metodou teplotního šoku (Froger & Hall, 2007). Po provedení transformace jsme buňky kultivovali v 1 ml SOC média 1 – 2 hodiny na třepačce při 220 otáčkách za minutu a 37 °C. Transformované buňky jsme vysévali na agarové plotny, které jsme každou dříve potřeli ampicilinem (100 µg/ml). Plotny s bakteriemi jsme inkubovali přes noc ve 37 °C.

Druhý den jsme vybrali několik kolonií a přenesli je na nové plotny s ampicilinem a nechali opět inkubovat přes noc. Zároveň jsme provedli Colony PCR. Výsledek jsme zkontrolovali pomocí agarózové elektroforézy a pozitivní kolonie jsme naočkovali do 30 ml sterilního 100% LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a v 50ml plastové zkumavce inkubovali přes noc ve třepačce při 37 °C a frekvenci 220 otáček za minutu.

Další den jsme z bakterií izolovali plazmidy metodou miniprep. Plazmidy jsme nechali osekvenovat s použitím primerů specifických pro vektor pJET, které jsou součástí CloneJET PCR Cloning kitu. Sekvence získané oběma primery jsme skombinovali pomocí programu SeqMan (DNASTAR) a zkontrolovali, zda odpovídají našemu požadovanému úseku a zda neobsahují chyby. Vybrali jsme jednu vhodnou sekvenci a dále pracovali již pouze s plazmidem, ze kterého pocházela.

Plazmid jsme štěpili pomocí restričních endonukleáz rozpoznávajících štěpící místa na primerech. Produkty štěpení jsme rozdělili agarózovou elektroforézou a vyřezali jsme pruhy obsahující požadovaný úsek. Stejný postup štěpení se stejnými endonukleázami jsme aplikovali na plazmid pUG35 určený pro transformaci kvasinek. Požadovaný insert a plazmid jsme následně ligovali přes noc při 16 °C, případně 10 minut při 22 °C a získanou ligační směsí jsme transformovali kompetentní buňky *E. coli* XL1, stejným postupem jako v prvním kroku. Bakterie jsme vysévali na plotny potřené 40 µl ampicilinu a inkubovali přes noc ve 37 °C.

Druhý den jsme kolonie bakterií přenesli na nové plotny s ampicilinem a provedli Colony PCR. Vybrané kolonie jsme napěstovali ve 3ml 100% LB média ampicilinem (100 µg/ml) přes noc na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Plazmidy jsme opět vyizolovali metodou miniprep a opět ověřili správnost jejich sekvencí sekvenováním. Kontrolovali jsme, zda jsou ve správném čtecím rámci, obsahují start-kodón, neobsahují stop-kodóny a zda je k nim správně připojena sekvence zeleného fluorescenčního proteinu (GFP).

#### 5.2.4. Transformace *S. cerevisiae*

Použité chemikálie:

- 40% polyethylenglykol (PEG)
  - destilovaná voda: 100 ml,
  - PEG (Sigma): 40 ml,
  - sterilizováno klávováním 20 minut při 121°C.
- 100 mM octan lithný (LiAc)
  - destilovaná voda: 15 ml,
  - LiAc (ICN Biomedicals): 99 mg,

- sterilizováno filtrací (Rotilabo-syringe filters, Roth, P666.1)
- 1M octan lithný (LiAc)
  - destilovaná voda: 50ml,
  - LiAc (ICN Biomedicals): 3,3 g,
  - sterilizováno klávováním 20 minut při 121°C.
- DNA z lososích spermií (SSD, Sigma)

Postup:

Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s 1 ml destilované vody jsme přidali kolonii kvasinek (případně pelet z kultury pěstované přes noc a centrifugované 1 minutu při 4000 g), kvasinky jsme resuspendovali a centrifugovali 1 minutu při 4000 g a pokojové teplotě. Supernatant jsme vylili a k peletu kvasinek přidali 1 ml 100 mM octanu lithného (LiAc) a mikrozkušavku se směsí jsme inkubovali 10 minut při 37 °C na vyhřevném bločku QBD2 (Grant).

Připravili jsme roztok se složením:

- 40% PEG: 300 µl,
- 1M LiAc: 42 µl,
- SSD: 10 µl,
- plazmid: 18 µl.

Mikrozkušavku se směsí obsahující kvasinky jsme vyjmuli z bločku a centrifugovali 1 minutu při 1000 g a pokojové teplotě. Supernatant jsme vylili a pelet jsme resuspendovali v připraveném roztoku obsahujícím plazmid. Směs jsme inkubovali 30 minut při 30 °C ve vodní lázni a následně dalších 30 minut při 42 °C na bločku.

Směs obsahující kvasinky jsme centrifugovali 1 minutu při 1000 g a pokojové teplotě, vylili jsme supernatant a pelet jsme resuspendovali v 200 µl dH<sub>2</sub>O. Buňky jsme vysévali na plotny se selekčním médiem -URA a kultivovali 3 dny při 30 °C.

### 5.2.5. Fixace *S. cerevisiae* pro imunofluorescenční mikroskopii

Použité chemikálie:

- MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, M7512)
- 1% agaróza
  - dH<sub>2</sub>O: 50ml,
  - agaróza: 0,5 g,
  - vysterilizováno klávováním (případně i po každém použití).

Postup:

Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s 1 ml dH<sub>2</sub>O jsme přidali kolonii transformovaných kvasinek a fluorescenční barvu MitoTracker značící mitochondrie (1:10000). Směs jsme inkubovali 20 minut ve tmě ve zkumavce s otevřeným víčkem, aby kvasinky měly přísun kyslíku. Poté jsme směs centrifugovali 1 minutu při 1000 g a pokojové teplotě. Vylili jsme supernatant, pelet



resuspendovali v 1 ml dH<sub>2</sub>O a opakovali centrifugaci, Toto promytí jsme ještě jednou zopakovali. Promytý pelet jsme resuspendovali v 50 µl dH<sub>2</sub>O.

Jednoprocentní agarózu jsme rozpustili zahříváním v mikrovlnné troubě a nechali stát v pokojové teplotě, aby částečně vychladla. Na čistá podložní sklíčka Superfrost PLUS (Thermo scientific) jsme nanášeli 10 µl resuspendovaných transformovaných kvasinek spolu s 10 µl 1% agarózy, kvasinky jsme s agarózou smíchali a ihned překryli krycím sklíčkem. Preparáty jsme uchovávali ve tmě, dokud jsme je neprohliželi fluorescenčním mikroskopem IX81 s kamerou IX2-UCB a softwarem Cell<sup>^</sup>R.

### 5.2.6. Příprava lyzátu *S. cerevisiae* pro analýzu imunoblotem

Použité chemikálie:

- 2M NaOH
- β-merkapt ethanol
- 50% trichloroctová kyselina - TCA (Sigma, T0699)
- aceton (Penta, 150906)
- vzorkový pufr I (příprava viz níže)
- 1M Tris base (Sigma, T1503)

Postup:

Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s 1 ml dH<sub>2</sub>O jsme přidali kolonii transformovaných kvasinek a přidali 148 µl 2M NaOH a 12 µl β-merkapt ethanolu. Tuto směs jsme inkubovali 10 minut na ledu. Poté jsme ke směsi přidali 160 µl TCA a znovu inkubovali 10 minut na ledu. Mikrozkušavku se směsí jsme centrifugovali 2 minuty při 17200 g a 4 °C. Odstranili jsme supernatant a pelet resuspendovali v 500 µl acetonu. Zopakovali jsme centrifugaci a odstranili supernatant. Pelet jsme resuspendovali v 50 µl 1x I a přikapávali Tris base, dokud směs nezměnila barvu ze žluté na modrou. Směs jsme 5 minut povařili a analyzovali prostřednictvím SDS PAGE.

## 5.3. Práce s nukleovými kyselinami

### 5.3.1. Izolace RNA pomocí ethanol-chloroformové extrakce

Použité chemikálie:

- Tri Reagent (Ambion, AM9738),
- chloroform,
- isopropanol,
- 75% ethanol vychlazený na -20 °C,
- dH<sub>2</sub>O.

Postup:

Médium 3% LB s buňkami trimastixe po filtraci jsme centrifugovali při 3000 g po dobu 10 minut v centrifuze vychlazené na 4 °C. Odstranili jsme supernatant a pelet jsme resuspendovali v 1 ml Tri Reagent. Směs jsme přenesli do 1,5 ml mikrozkušavky a přidali k ní 200 µl chloroformu. Mikrozkušavku se směsí jsme cca 15 s třepali na vortexu a poté nechali 2 minuty stát v pokojové teplotě.

Po odstátí jsme směs centrifugovali při 15000 g po dobu 15 minut v teplotě 4 °C. Horní ze 3 fází, které se ve zkumavce utvořily, jsme opatrně odsáli a přenesli do nové mikrozkušavky s 500 µl isopropanolu. S touto směsí jsme zopakovali protřepání na vortexu a tentokrát nechali stát v pokojové teplotě po 10 minut. Zopakovali jsme centrifugaci při 15000g a 4 °C, nyní již jen po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu jsme k peletu přidali 1 ml vychlazeného ethanolu. Zopakovali jsme předchozí centrifugaci. Odstranili jsme supernatant a pelet nechali částečně vyschnout. Pelet jsme resuspendovali v 20 µl destilované vody. RNA jsme skladovali v -20 °C.

### 5.3.2. Selekcce mRNA a syntéza cDNA

Selekci eukaryotické mRNA jsme prováděli pomocí Dynabeads mRNA purification kitu (Invitrogen, 610.06). Postupovali jsme podle protokolu dodaného výrobcem. K syntéze cDNA z takto vyselektované mRNA jsme použili High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, 4390777). Postupovali jsme podle protokolu dodaného výrobcem. Takto získanou cDNA jsme skladovali v -20 °C.

### 5.3.3. Polymerázová řetězová reakce – PCR

Použité primery:

Označení primeru	sekvence	účel
Tp-H-NdeIF	CATGCATATGCAGCGCCTTTCTCTGTC	Příprava protilátek
Tp-H-XhoIR	TGACCTCGAGATGCTGGGTCTTGAGGAA	
Tp-cpn60-NdeIF	CATGCATATGCAGGCCCTGTTTTCCACT	Příprava protilátek
TrimCpn60-XhoIR	TGACCTCGAGGAATGGCTTGGGCAGGCC	
Tp-H2ase2-NdeIF	CATGCATATGGAGCCCGGCGTTGTGACC	Příprava protilátek
Tp-H2ase2-XhoIR	TGACCTCGAGGGAACGCTCCTTGTGGACGCA	
TpH2Xbal	CATGTCTAGAATGGAGCCCGGCGTTGTGACC	Transformace kvasinek
TpH2HindIII	TGACAAGCTTGATGCCGGCCACGCGGTCA	
TpH3Xbal	CATGTCTAGAATGGAATCTGGCTGTGTTACTGCT	Transformace kvasinek
TpH3HindIII	TGACAAGCTTAGAACCGACGAGAAGGGGC	

Používali jsme komerčně dostupné předpřipravené směsi pro PCR: EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa, RR310), EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TaKaRa, RR320) a PrimeSTAR Max Premix (TaKaRa, R045), přidávali jsme 1 – 2 µl a program cyklieru jsme nastavovali podle protokolu dodaného výrobcem PCR směsi. Teploty nasedání (annealing temperature) jsme upravovali podle konkrétních primerů. Používali jsme cyklieru: MyCycler thermal cycler a T100 thermal cycler (Bio-Rad). Při „colony PCR“ jsme místo cDNA přidávali bakterie z kolonií v množství zhruba odpovídajícím 1 – 2 µl.

DNA naamplifikovanou pomocí PCR jsme, bylo-li třeba, přečistili a zakoncentrovali pomocí DNA clean and concentrator kitu (Zymo research, D4014). Postupovali jsme podle protokolu dodaného výrobcem.

### 5.3.4. Agarózová elektroforéza

Tuto metodu jsme používali pro zjištění přítomnosti a konkrétní délky úseků DNA v roztocích pocházejících z PCR, případně po štěpení DNA restrikčními endonukleázami. Stejnou metodu, pouze s použitím větší vrstvy agaróзовého gelu a širších jamek, jsme používali také na izolaci úseku DNA o konkrétní délce z těchto roztoků.

Použité chemikálie:

- prášková agaróza
- TAE pufr (Bio-Rad, A4686)
- SYBR safe
- GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, SM0333)
- 6x DNA loading dye (Thermo Scientific, R0611)

Postup:

Do 1x TAE pufru v Erlenmayerově baňce jsme přidali práškovou agarózu v poměru 0,1 g agarózy na 10 ml pufru (nejčastěji 0,4 g na 40 ml) a směs nechali zahřívát v mikrovlnné troubě, dokud nevzkypěla. Poté jsme ji nechali částečně zchladnout a přidali SYBR safe v poměru 1  $\mu$ l SYBR na 1 ml pufru. Směs jsme nalili do k tomu určené plastové vany, vložili do ní plastový „hřeben“ pro vytvoření jamek na vzorky a nechali cca 20 minut tuhnout.

Po utužení jsme gel umístili do elektroforetického přístroje naplněného TAE puftrem, odstranili „hřeben“ a jamky jsme naplnili délkovým standardem a vzorky. Aplikovali jsme napětí 100 V po dobu 20 minut (při pouhém ověřování výsledků reakcí), nebo 80 V po dobu 40 minut (pokud jsme měli v úmyslu vyřezávat z gelu pruhy).

Gely jsme fotografovali pod UV zářením, případně z nich vyřezávali pruhy pod modrým světlem. Vyřezané pruhy jsme přečistili pomocí Zymoclean Gel DNA recovery kitu (Zymoresearch, D4008). Postupovali jsme podle protokolu dodaného výrobcem.

### 5.3.5. Izolace plazmidů metodou „miniprep“

Pro izolaci plazmidů jsme používali High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, 11 754 785 001) a postupovali jsme podle protokolu dodaného výrobcem. Plazmidy jsme eluovali do 50  $\mu$ l elučního pufru. Koncentraci DNA jsme měřili pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000. Plazmidy jsme uchovávali v -20 °C.

### 5.3.6. Sekvenování DNA Sangerovou metodou.

PCR produkty a plazmidová DNA byly sekvenovány v sekvenační laboratoři PŘF UK v Praze. Sekvenační směs obsahovala 0,4  $\mu$ l primeru (zhruba 3,2 pmol) a 5 - 10 ng PCR produktu na 100 bp produktu. V případě potřeby byla reakce doplněna vodou PCR kvality. Reakce měly objem 14 nebo 8  $\mu$ l.

### 5.3.7. Štěpení plazmidů restrikčními endonukleázami

Použité chemikálie:

- 10x Buffer Tango (Fermentas, BY5)
- 10 x Fast Digest Green Buffer (Thermo Scientific, B72)
- NdeI restrikční endonukleáza, 10 U/ $\mu$ l (Thermo Scientific, ER0582)
- XhoI restrikční endonukleáza, 10 U/ $\mu$ l (Thermo Scientific, ER0691)
- XbaI restrikční endonukleáza 10 U/ $\mu$ l (Thermo Scientific, FD0684)
- HindIII restrikční endonukleáza 10 U/ $\mu$ l (Thermo Scientific, ER0501)

Restrikční směsi jsme míchali takto, případně v násobcích uvedených množství:

- Inkubace přes noc ve 37 °C
  - DNA: 5  $\mu$ l,
  - H<sub>2</sub>O (PCR grade): 3,5  $\mu$ l,
  - 10x Buffer Tango: 1  $\mu$ l,
  - XbaI: 0,2  $\mu$ l,

- HindIII: 0,6  $\mu$ l.
- Inkubace 30 minut ve 37 °C
  - DNA: 10  $\mu$ l,
  - H<sub>2</sub>O (PCR grade): 12  $\mu$ l,
  - 10x Fast Digest Green Buffer: 3  $\mu$ l,
  - XhoI: 1  $\mu$ l, nebo XbaI: 1  $\mu$ l,
  - NdeI: 1  $\mu$ l, nebo HindIII: 1  $\mu$ l.

## 5.4. Práce s proteiny

### 5.4.1. Příprava rekombinantního proteinu

Použité chemikálie:

- LB agar (příprava viz kapitola 5.1.2)
- 100% LB médium (příprava viz kapitola 5.1.2)
- Ampicilin (100  $\mu$ g/ml)
- Kanamycin (50  $\mu$ g/ml)
- SOC médium
  - trypton: 20 g,
  - extrakt z kvasinek: 5 g,
  - NaCl: 0,5 g,
  - KCl: 0,186 g,
  - MgCl<sub>2</sub>: 0,952 g,
  - MgSO<sub>4</sub>: 2,408 g,
  - glukóza: 3,603 g,
  - Doplněno destilovanou vodou na 1000 ml.
- IPTG (0,1 M)
- X-Gal
  - 5-bromo-4chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid: 100 mg,
  - N,N'- dimethylformamid: 2 ml.

Postup:

Požadovaný úsek DNA jsme amplifikovali pomocí PCR se specifickými primery obsahujícími restrikční místa. Produkty PCR jsme pomocí agaróзовé elektroforézy rozdělili podle délky a požadovaný úsek jsme vyřízli a přečistili pomocí Zymoclean Gel DNA recovery kitu. Tato získanou DNA jsme zaligovali do plazmidu pGEM-T easy vector system (Promega) podle protokolu dodaného výrobcem. Ligační směsí jsme transformovali kompetentní buňky *E. coli* TOP10, případně XL1, pomocí metody teplotního šoku (Froger & Hall, 2007). Po provedení transformace jsme buňky kultivovali v 1 ml SOC média 1 – 2 hodiny na třepačce při 220 otáčkách za minutu a 37 °C. Transformované buňky jsme vysévali na agarové plotny, které jsme každou dříve potřeli 100  $\mu$ l IPTG, 40  $\mu$ l ampicilinu a 20  $\mu$ l X-Galu. Plotny s bakteriemi jsme inkubovali přes noc ve 37 °C.

Druhý den jsme vybrali bílé kolonie bakterií, přenesli je na nové plotny (připravené stejným způsobem jako ty pro výsev čerstvě transformovaných bakterií) a nechali opět inkubat přes noc.

Zároveň jsme provedli Colony PCR. Výsledek jsme zkontrolovali pomocí agarózové elektroforézy a pozitivní kolonie jsme naočkovali do 3 ml sterilního 100% LB média ampicilinem (100 µg/ml) a v 15ml plastové zkumavce inkubovali přes noc ve třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM.

Další den jsme z kultur bakterií izolovali plazmidy metodou miniprep. Plazmidy jsme nechali osekvenovat s použitím primerů SP6 a T7. Sekvence získané oběma primery jsme skombinovali pomocí programu SeqMan (DNASTAR) a zkontrolovali, zda odpovídají našemu požadovanému úseku a zda neobsahují chyby. Vybrali jsme jednu vhodnou sekvenci a dále pracovali již pouze s plazmidem, ze kterého pocházela.

Plazmid jsme štěpili pomocí restričních endonukleáz rozpoznávajících restriční místa na primerech. Produkty štěpení jsme rozdělili agarózovou elektroforézou a vyřezali jsme pruhy obsahující vyštěpený požadovaný úsek. Stejný postup štěpení se stejnými endonukleázami jsme aplikovali na plazmid pET42b (Novagen). Požadovaný inzert a plazmid jsme následně ligovali přes noc při 16 °C a získanou ligační směsí jsme transformovali kompetentní buňky *E. coli* TOP10, případně XL1 Blue, stejným postupem jako v prvním kroku. Bakterie jsme vysévali na plotny potřené 40 µl kanamycinu (50 µg/ml) a inkubovali přes noc ve 37 °C.

Druhý den jsme kolonie bakterií přenesli na nové plotny s kanamycinem a provedli Colony PCR. Vybrané kolonie jsme napěstovali ve 3 ml 100% LB média s kanamycinem (50 µg/ml) přes noc na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Plazmidy jsme opět vyizolovali metodou „miniprep“ a opět ověřili správnost jejich sekvencí sekvenováním.

Vybraným plazmidem jsme transformovali expresní buňky *E. coli* BL21 DE3. Opět jsme aplikovali stejný postup transformace metodou teplotního šoku a buňky jsme vyseli na plotnu s kanamycinem (50 µg/ml) a inkubovali přes noc.

Abychom ověřili, zda transformované bakterie BL21 skutečně exprimují požadovaný polypeptid, provedli jsme pokusnou indukci exprese. Kolonie BL21 jsme přenesli do 3 ml 100% LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a na třepačce inkubovali přes noc při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Druhý den jsme 200 µl narostlé kultury přenesli do 3 ml nového 100% LB média (zde již není nutné přidávat kanamycin) a dali opět inkubovat na třepačku. Když optická denzita kultury při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ) dosáhla hodnoty 0,6, odebrali jsme 1 ml kultury jako neindukovanou kontrolu. Vzorek jsme zcentrifugovali, pelet resuspendovali ve vzorkovém pufru 1x I a považili 5 minut. Vzorek jsme uchovávali při -80 °C.

Ke zbytku kultury jsme přidali sterilní IPTG tak, aby výsledná koncentrace byla 0,5 mM. Kulturu jsme inkubovali 4 hodiny na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM, případně přes noc při 30 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. S výslednou kulturou jsme zopakovali stejný postup jako se dříve odebranou neindukovanou kontrolou. Se všemi vzorky jsme provedli SDS PAGE elektroforézu a porovnali výsledky u indukovaných a neindukovaných buněk.

Podle výsledků pokusné exprese jsme vybrali jednu z transformovaných kolonií a přenesli ji do 10 ml 100% LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a inkubovali přes noc na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Druhý den jsme kulturu přenesli do 1 l 100% LB média (bez kanamycinu) a inkubovali na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM, dokud  $OD_{600}$  nedosáhla zhruba hodnoty 0,6. Odebrali jsme vzorek 1 ml jako neindukovanou kontrolu a ke

zbytku kultury přidali sterilní IPTG tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,1mM. Kulturu jsme inkubovali přes noc na třepačce při 30 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Buňky jsme centrifugovali 10 minut při 6000 g. Pelet jsme uchovávali při -80 °C.

#### 5.4.2. Test solubility rekombinantního proteinu

Použité chemikálie:

- Lyzační pufr pro nativní purifikaci proteinů
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6,9 g (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O),
  - NaCl: 17,54 g,
  - imidazol: 0,68 g,
  - dH<sub>2</sub>O: 1 l,
  - upraveno pH na 8,0 pomocí NaOH.

Postup:

Kolonii BL21 jsme přenesli do 10 ml 100% LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a na třepačce inkubovali přes noc při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Druhý den jsme 2,5 ml narostlé kultury přenesli do 50 ml nového 100% LB média (bez kanamycinu) a dali opět inkubovat na třepačku. Když optická denzita kultury při vlnové délce 600 nm (OD<sub>600</sub>) dosáhla hodnoty 0,6, odebrali jsme 1 ml kultury jako neindukovanou kontrolu. Vzorek jsme zcentrifugovali, pelet resuspendovali ve vzorkovém pufru 1x l a povařili 5 minut. Ke zbytku kultury jsme přidali sterilní IPTG tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Kulturu jsme inkubovali 4 hodiny na třepačce při 37 °C a frekvenci otáčení 220 RPM, případně přes noc při 30 °C a frekvenci otáčení 220 RPM. Odebrali jsme 1 ml jako indukovanou kontrolu a zopakovali stejný postup jako v případě neindukované kontroly. Zbytek kultury jsme centrifugovali 5 minut při 6000 g a 4 °C. Supernatant jsme odstranili.

Pelet jsme resuspendovali v 5 ml lyzačního pufru (pro nativní purifikaci proteinů) a třikrát jej v plastové zkumavce ponořili do kapalného dusíku a následně do vlažné vody, dokud neroztál. Poté jsme vzorek sonikovali po 1 minutu s amplitudou 60 a délkou pulzů 5 s. Lyzát jsme centrifugovali 30 minut při 10000 g a 4 °C. Odebrali jsme supernatant a uchovávali jej na ledu. Pelet jsme resuspendovali v 5 ml lyzačního pufru. K oběma vzorkům jsme přidali pufr l a vařili je 5 minut. Vzorky neindukované kontroly, indukované kontroly, supernatantu a peletu jsme analyzovali pomocí SDS PAGE.

#### 5.4.3. Denaturační purifikace rekombinantního proteinu

Použité chemikálie:

- Roztok DNáz (Thermo, EN0521)
- Lysozym (Sigma, SLBC9111)
- Ni-NTA agaróza „PerfectPro Ni-NTA agarose“ (5prime, 2400010)
- Lyzační pufr B (1 l)
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 13,8 g (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O),
  - Tris· Cl: 1,2 g,

- močovina: 480,5 g,
- upraveno pH na 8,0 pomocí NaOH.
- Promývací pufr C (1 l)
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 13,8 g ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),
  - Tris· Cl: 1,2 g,
  - močovina: 480,5 g,
  - upraveno pH na 6,3 pomocí HCl.
- Eluční pufr D (1 l)
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 13,8 g ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),
  - Tris· Cl: 1,2 g,
  - močovina: 480,5 g,
  - upraveno pH na 5,9 pomocí HCl.
- Eluční pufr E (1 l)
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 13,8 g ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
  - Tris· Cl: 1,2 g,
  - močovina: 480,5 g,
  - upraveno pH na 4,5 pomocí HCl.

Postup:

Po rozmrazení jsme pelet resuspendovali v lyzačním pufru B (5 ml pufru na 1g peletu) a přidali roztok DNázy (1  $\mu\text{l}$  na 1 ml směsi) a lysozym (1 mg na 1 ml směsi). Směs jsme 2x až 3x homogenizovali pomocí přístroje French press. Poté jsme směs centrifugovali 30 minut při 40000 g a 4 °C. Supernatant jsme odebrali a uchovávali na ledu.

Odebrali jsme 8 ml supernatantu a přidali 2 ml Ni-NTA agarózy. Směs jsme ponechali 1 hodinu na třepačce při 200 otočkách za minutu a pokojové teplotě. Směs jsme přenesli do kolony (Poly-Prep Chromatography Columns, Bio-Rad), odstranili spodní čepičku kolony a zachytávali vytékající roztok (flow-through). Kolonu jsme 2x promývali 4 ml pufru C, 4x 0,5 ml pufru a 4x 0,5 ml pufru E. Vytékající roztoky jsme jímali zvlášť. Pomocí SDS PAGE jsme analyzovali vzorku lyzátu, flow-through a roztoků po promytí pufrům C a eluci pufrů D a E. Na základě výsledků SDS PAGE jsme vybrali 1 roztok po promytí pufrům D nebo E a požadovaný protein jsme vyextrahovali pomocí separační elektroforézy.

#### 5.4.4. Separační elektroforéza SDS PAGE

Složení roztoků viz kapitola 5.4.7.

Postup:

Používali jsme elektroforetický přístroj Hoefer SE600 a gely jsme nalili podle předpisu:

- Running gel (2x)
  - A: 20,8 ml,
  - C: 26 ml,
  - $\text{H}_2\text{O}$ : 4,2 ml,
  - TEMED: 30  $\mu\text{l}$ ,



- G: 670  $\mu$ l.
- Stacking gel (2x)
  - A: 2,78 ml,
  - D: 8,5 ml,
  - H<sub>2</sub>O: 5,4 ml,
  - TEMED: 5  $\mu$ l,
  - G: 185  $\mu$ l.

Zpočátku jsme aplikovali napětí 120 V a ve chvíli, kdy vzorky prošly celým stacking gelem, jsme napětí zvýšili na 200 V. Gel jsme vyjmuli ze skel a barvili pomocí barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue (CBB). Po odbarvení odbarvovacím roztokem jsme vyřídili pruh obsahující požadovaný protein a promývali jej nejdříve přes noc (při pokojové teplotě) destilovanou vodou a následně 4x 30 minut na třepačce v pokojové teplotě sterilním PBS. Pruh gelu jsme homogenizovali skleněným homogenzátorem Dounce o objemu 7 ml a resuspendovali ve sterilním PBS tak, aby výsledný objem směsi nepřesáhl 2 ml. Směs jsme použili na imunizaci laboratorních potkanů.

#### **5.4.5. Příprava protilátek imunizací potkanů**

Laboratorní potkany jsme nechali nejdříve aklimatizovat. Po 2 týdnech jsme jim odebrali zhruba 1 ml krve z ocasu. Krevní sérum, naředěné 1:100 v blokovacím roztoku, jsme testovali metodou imunoblotu, zda protilátky v něm přirozeně obsažené nerozpoznávají antigeny z různých frakcí trimastixe připravených jednoduchou frakcionací a bakterií z kultury. Když byl výsledek negativní, nebo protilátky reagovaly pouze slabě, pokračovali jsme s imunizací, případně jsme pro imunizaci vybrali jedince s nejlepším výsledkem.

Pro každou imunizaci jsme použili zhruba 2 ml rozdrčeného gelu s antigenem v PBS, což odpovídá přibližně 300  $\mu$ g gelu. Směs jsme vstříkli injekční stříkačkou se sterilní jehlou uspanému potkanovi do podkoží, do oblasti ramenních pletenců a stehen. Imunizaci jsme opakovali alespoň 4x, pokaždé s odstupem 28 dní. Přesně 10 dní po 3., 4., případně 5. imunizaci jsme opět odebrali zhruba 1 ml krve z ocasu a znovu testovali imunoblotem na frakcích trimastixe. Membránu jsme se sérem inkubovali 1 hodinu v pokojové teplotě a následně přes noc ve 4 °C. Když jsme testovacím imunoblotem zaznamenali, že sérum již obsahuje požadované protilátky, potkana jsme uspali, vykřvili a usmrtili.

#### **5.4.6. Zpracování krve odebrané laboratorním potkanům**

Odebranou krev jsme nechali stát 30 minut v pokojové teplotě. Poté jsme ji centrifugovali 15 minut při 2000 g a pokojové teplotě. Odebrali jsme supernatant a centrifugaci s ním opakovali. Supernatant (sérum) jsme odebrali do nových zkumavek a uchovávali v -80 °C.

#### **5.4.7. Polyakrylamidová denaturační proteinová elektroforéza (SDS PAGE)**

Použité roztoky:

- Roztok A
  - 30% Acrylamide/Bis solution, 29:1 (Bio-Rad, 161-0146).

- Roztok B
  - SDS - sodium dodecyl sulfát (Serva, 20765): 1 g,
  - dH<sub>2</sub>O: 10ml.
- Roztok C
  - Tris (Trizma base): 9,1 g,
  - SDS, pH=8,8: 0,2 g,
  - doplněno dH<sub>2</sub>O do 100 ml.
- Roztok D
  - Tris, pH=6,8: 3 g,
  - SDS: 0,2 g,
  - doplněno dH<sub>2</sub>O do 100ml.
- Roztok E
  - 1x TGS (Bio-Rad, 1610772).
- Roztok F
  - 10 mg Bromfenolové modři na 1ml roztoku D bez SDS.
- Roztok G
  - persíran amonný: 1 g,
  - dH<sub>2</sub>O: 10 ml.
- TEMED (Sigma Life Science, 058K1152).
- Velikostní standarty
  - PageRuler plus prestained protein ladder (Thermo scientific, 26619).
  - PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo scientific, 26616)
- Vzorkový pufr I (5x I)
  - roztok D (bez SDS): 2,4 ml,
  - roztok C: 2 ml,
  - glycerol: 2,5 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 1,6 ml,
  - roztok F: 1 ml,
  - 2-merkptoethanol: 0,5 ml.
- Vzorkový pufr I (1x I)
  - roztok D (bez SDS): 2,4 ml,
  - roztok C: 2 ml,
  - glycerol: 1 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 4 ml,
  - roztok F: 0,1 ml,
  - 2-merkptoethanol: 0,5 ml.
- Barvicí roztok Coomasie brilliant blue – CBB
  - CBB (Serva, 17525): 250 mg,
  - ethanol: 225 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 225 ml,
  - kyselina octová: 50 ml.
- Odbarvovací roztok na CBB
  - ethanol: 250 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 650 ml,

- kyselina octová: 100 ml.

Postup:

Pro SDS PAGE jsme použili elektroforetický přístroj Mini-protean 3 (Bio-Rad) s gely o rozměrech 7 x 8 cm a spacerem 0,75 mm. Gely jsme nalévali podle tabulky:

1 gel, spacer: 0,75 mm						
	10 %	12 %	13,5 %	15 %	Stack	5 %
<b>A (ml)</b>	1,36	1,6	1,8	2		0,24
<b>C (ml)</b>	2	2	2	2		<b>D (ml): 0,75</b>
<b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>	0,64	0,32	0,2	0		0,47
<b>TEMED (μl)</b>	5	5	5	5		5
<b>G (μl)</b>	40	40	40	40		20

Zpočátku jsme aplikovali napětí 70 V a ve chvíli, kdy vzorky prošly celým stacking gelem, jsme napětí zvýšili na 120 V. Pokud jsme měli v úmyslu použít výsledky elektroforézy v navazujícím imunoblotu, pokračovali jsme podle postupu uvedeného níže.

Pokud jsme neměli v úmyslu pokračovat imunoblotem, ale pouze zviditelnit výsledky elektroforézy, pak jsme opatrně rozebrali skla, odřízli pruh stacking gelu a running gel s proteiny nechali přes noc barvit v CBB. Druhý den jsme gel promývali odbarvovacím roztokem, dokud se nezvýraznily pruhy jednotlivých proteinů.

#### 5.4.8. Imunoblot – „Western Blot“

Použité roztoky:

- PBS
  - NaCl: 8 g,
  - KCl: 0,2 g,
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,44 g,
  - dH<sub>2</sub>O: 1000 ml.
- Blokovací roztok (1%)
  - odtučněné sušené mléko: 1 g,
  - TWEEN (Sigma-Aldrich, 047K00201): 250 μl,
  - PBS: 100 ml.
- Blotovací pufr
  - 10x TGS (Bio-Rad, 161-0772): 100 ml,
  - Metanol: 200 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 700 ml.
- Ponceau
  - Ponceau S (Sigma-Aldrich, P3504): 0,1 g,
  - kyselina octová: 5 ml,
  - dH<sub>2</sub>O: 95 ml.

- Primární protilátky
  - Anti-TpGCSH (vlastní příprava imunizací potkana, viz kapitola 5.4.5)
  - GFP (B-2) Muse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-9996)
- Sekundární protilátky
  - Anti-mouse IgG (Sigma, 079K6034)
  - Anti-Rat IgG (Sigma, 070M6110)

Postup:

Po dokončení SDS PAGE proteinové elektroforézy jsme oddělili skla od gelu a odřízli stacking gel. Zbýlý plátek gelu jsme změřili a ponořili do blotovacího pufru. Vystřihli jsme 2 obdélníky extra silného filtračního papíru (Bio-Rad) tak, aby byly na každém okraji o cca 2 mm větší než plátek gelu, a ponořili je do blotovacího pufru. Z nitrocelulóзовé membrány jsme vystřihli 1 obdelník tak, aby byl na každém okraji o cca 4 mm větší než plátek gelu, a také ponořili do blotovacího pufru. Filtrační papíry, membránu a plátek gelu jsme poskládali do blotovacího přístroje Fastblot (Biometra) v tomto pořadí odspoda vzhůru: papír, membrána, gel, papír. Přitom jsme dbali na to, aby se filtrační papíry navzájem nedotýkaly. Celý soubor papírů, membrány a gelu jsme opatrně přejeli plastovou zkumavkou, abychom vytlačili případné bubliny vzduchu. Blotovací přístroj jsme zavřeli, připojili na zdroj napětí a nastavili hodnotu napětí podle konkrétní velikosti plátku gelu tak, aby na každý 1 cm<sup>2</sup> připadalo 1,5 mA. Toto napětí jsme nechali působit po dobu 1 hodiny. Blotovací přístroj jsme otevřeli a membránu po vyjmutí obarvili Ponceau. Po mírném odbarvení destilovanou vodou jsme tužkou označili pozice sloupců a následně odmyli zbytek Ponceau destilovanou vodou. Membránu jsme ponořili do blokovacího roztoku a nechali v něm přes noc v lednici při 4 °C.

Druhý den jsme membránu buď rozřezali na jednotlivé proužky, nebo nechali vcelku. Proužky jsme umístili do plastové inkubační vaničky a přidali blokační roztok s primární protilátkou naředěnou podle aktuálních potřeb. Pokud jsme plánovali použít stejnou primární protilátku o stejné koncentraci na všechny proužky, membránu jsme nerozřezávali a vcelku jsme ji vložili do plastového pytlíku, který jsme naplnili blokačním roztokem s primární protilátkou a uzavřeli zatavením. Membránu jsme inkubovali s primární protilátkou alespoň 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě. Poté jsme odlili roztok s primární protilátkou a přidali blokační roztok bez protilátky a nechali v něm membránu promývat 10 minut na třepačce. Promytí jsme 3x opakovali. Po promytí jsme přidali blokovací roztok se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou a nechali inkubovat na třepačce 1 hodinu. Poté jsme membránu opět 2x promyli blokovacím roztokem a 1x PBS (bez TWEENu). Po promytí jsme PBS slili a membránu polili vyvolávacím roztokem připraveným z tablet SigmaFAST BCIP/NBT (Sigma, B5655). Vyvolávací roztok jsme připravili přidáním jedné nadrcené tablety do 10 ml PBS.

## 5.5. Bioinformatické metody

Pro zobrazování a úpravu sekvenčních dat jsme používali programy SeqMan (DNASTAR) a BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences). Pro tvorbu alignmentu více sekvencí jsme používali algoritmus ClustalW (Thompson et al., 1994) v rámci programu BioEdit. Pro odhalování sekvenční podobnosti jsme používali varianty algoritmu BLAST (Altschul et al., 1990) v rámci programu BioEdit.

## 6. Výsledky

### 6.1. Analýza EST sekvencí

Pro tuto práci jsme měli k dispozici 644758 jednotlivých čtení cDNA získaných metodou 454 sekvenování, které byly složeny do 7037 kontigů. To je o 4351 kontigů více, než měli k dispozici Hampl et al. (2008). Jedním z našich cílů bylo využít tuto hojnost nových sekvenčních dat k nalezení dalších genů kódujících potenciálně mitochondriální proteiny. Z nově získaných sekvencí jsme vytvořili lokální nukleotidové databáze, jednak ze samotných sestavených kontigů, jednak z jednotlivých čtení, neboť v kontigech nejsou obsažena všechna čtení. Tyto databáze jsme prohledávali algoritmem BLASTn a tBLASTn prostřednictvím programu BioEdit, přičemž autor této práce se zaměřil zejména na proteiny účastnící se syntézy FeS center.

#### 6.1.1. Syntéza FeS center

Opět jsme pátrali po proteinech typicky mitochondriálního systému ISC, který je lokalizován v mitochondriálních organelách téměř všech eukaryot. Nenalezli jsme ovšem žádné homology ani jedné z relevantních sekvencí a to ani tehdy, pokud jsme pátrali s pomocí sekvencí z fylogeneticky blízkých organismů jako *T. vaginalis* nebo *G. intestinalis*. Stejně negativní výsledek poskytlo hledání homologů genů kódujících proteiny NIF systému.

Zato jsme objevili sekvence signifikantně podobné genům kódujícím některé proteiny třetího systému syntézy FeS center vyskytujícího se u eukaryot, SUF systému. Podařilo se nám identifikovat 4 sekvence odpovídající proteinům SUF systému: 2 homology SufB (box 1, 2), SufC (box 3) a SufS (box 4). U obou sekvencí SufB máme pravděpodobně k dispozici kompletní kódující sekvence, neboť obsahují start- i stop-kodóny na pozicích odpovídajících nejbližším bakteriálním homologům. U sekvencí SufC a SufS neznáme 5' ani 3' konce, protože start- i stop-kodóny chybí.

Abychom zvýšili jistotu, že jde skutečně o sekvence pocházející z transkriptomu, a potažmo genomu, trimastix, rozhodli jsme se po nich pátrat i v EST sekvencích nejbližšího příbuzného studovaného organismu, oxymonády *Monocercomonoides* izolátu Pa203. Zde jsme našli sekvence homologické SufB2 (box 5), SufC (box 6) i SufS (box 7).

Pro geny, ze kterých máme kompletní sekvence, tedy TpSufB1 a TpSufB2, jsme navrhli primery s restričními místy NdeI a XhoI. Tyto primery mohou být použity pro amplifikaci daných genů pomocí PCR a jejich inzerci do expresních plazmidů. Na další práci se geny SUF systému, ať už bioinformatické nebo imuno-lokalizační, se autor této práce nepodílel. Proto zde nejsou její výsledky uvedeny.

**Box 1: sekvence TpSufB1, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

>Tp\_SufB\_1

```
...TGAATGGAAAAGGATTTGTTTTAATAATCCTAATGCTGCAAGAACATGTGGCTGTGGAGAATCTTTtAGTTTATAAAA
TTATGGCAAAATATACCGAAGACGACTTACGCGAAGACCTCAAAACGAAaGAATACGAGGCCGGATTTTATACTGATAT
AGAGTATGAAGATTTTCCTATTGGTTTAAACGAAGAAATCGTAAAAATGATTTCTGCTAAAAaGAAGAACCAAGTTGG
ATGACAGATTGGCGTTTAGAATCTTCCGTATTTGGCAAAAaTGAAGAACCTAATTGGGCAAATATTAATATGAAA
AGCCAGATTTCCAAGCCATAAGATATTATGCTGCACCAAGAAAAaCCAGAACTTACAAGCCTAGACGAAGTAGACCC
AGAATTATTGAAAACTTTTGCGAAATTAGGAATCAATATAGAAgAGCAAAAACGTTTGGCTGGTGTTCGGTGGACATT
GTAATGGATTTCGTTTCAGTGAAAACACTTTTCAAGAACTTTGAAAGAAAAaGGAATTATTTCTGCTCGATTTCTGA
AGCGATTAATAATCATCCAGATTTAGTTCAAAAaTATATAGGGAAAGTTGTTCTAGAGGCGATAACTTCTATGCTGCAT
TAAATTCTGCGGTGTTTTAGACGGAAGTTTTGCTACATTCGAAAGGTATAAAATGTCGGATGGAACCTTCCACTTAT
TTcAGAATTAATCAAGCTGGGACAGGACAATTCGAGAGAACTTTGGTGATTGCTGATGAAGGAAGTTACGTTTCTTATTT
GGAAGGTTGTACTGCTCCTGCAAGAGACGAAAACCAATTGCATGCGGCCGTTGTAGAGTtAATTGCACTAGACGATGCA
GAAATTAATATTCTACCGTGCAAACTGGTTTCCAGGTGACGAAAaCGGAAAaGGAGGAGTTTTCAACTTTGTAACGA
AAAGAGGTCTTTGTGAGAAAAaCGCAAAAaTTTCTTGGACTCAAGTAGAAACCGTTCTGCCGTAACCTGGAAATATCC
TTCTTGATTTTGAAGGTGATAACGCTGTAGGAGAATTTtACTCTATCGCAGTTACCAATAATTTtCAATATGCAGATAC
AGGAACCAAGATGATTCACATTGGTAAAAaTACCAATCAACTATTATTtCTAAAGGAATTTCTGCGGGAAAACTAATA
ATTCTTACAGAGGTTTGGTAAAAGTGATGCCAAGTGCAAAAGGAGCAAGAACTTTTACAATGTGATTCTCTTTTGAT
GGGAAATGAATGTGGagCACACACTTCCCTTACATCGAAaTAAAAGACCCTTCGGCACAATTGGAACACGAAGCTACG
ACTTCTAAAATTGGAGAAGATCAAATTTtCTATTGCAACCAAGAGGGATTGACACCGAAAGAGCTATTGCACTGATTGT
AAATGGATTACAGCAAAGAAGTTCTCAATAAACTCCCAATGGAATTTGCAATAGAAGCACAGAAATTATTAGAAATTTCTT
TGGAAGGTTCTGTAGGATAATCA...
```

>Tp\_SufB\_1\_protein

```
MEKDLFLIILMLQEHVAVENLLVYKIMAKYTEDDLREDLKTKEYEAGFYTDIEYEDFPIGLNEEIVKMISAKKEEPSWMTDWRL
ESFRIWQKMEEPNWANIKYEKPDFQAIRYYAAPPKKPELTSLEVDPELLKTFAKLGINIEEQKRLAGVAVDIVMDSVSVKTF
QETLKEKGIIFCSISEAIKNHPDLVQKYIGKVVPRGDNFYAALNSAVFSDGSFCYIPKGKICPMELSTYFRINQAGTGQFERTLVI
ADEGSYVSYLEGCTAPARDENQLHAAVVELIALDDAEIKYSTVQNWFPDENGKGGVFNFTKRLCEKNAKISWTQVETG
SAVTWKYPSCILKGDNAVGEFYIAVTNNFQYADTGTKMIHIGKNTKSTIISKGISAGKSNNYSYRGLVKVMPSAKGARNFSQC
DLLLLMGNECGAHTFPYIEIKDPSAQLHEATTSKIGEDQIFYCNQRGIDTERIALIVNGFSKEVLNKLPMFEAIEAQKLEISLE
GSVG*
```

**Primery:**

CATGC <b>CATATG</b> AAAAGGATTTGTTTTA	Tp-SufB1-NdeIF1
CATGC <b>CATATG</b> CTGCAAGAACATGTGGCT	Tp-SufB1-NdeIF2
CATGC <b>CATATG</b> CAAAATATACCGAAGAC	Tp-SufB1-NdeIF3
TGAC <b>CTCGAG</b> TCCTACAGAACCTTCAA	Tp-SufB1-XhoIR

**Box 2: sekvence TpSufB2, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

**>Tp\_SufB\_2**

```
...AGTATGGAACCGGTTGTTAAGCTGAGTACAGATGAACCTGTTTTGGGCGACGACGAAACCGAAATTGGCGTCCCTGT
CGAAAATCCCGCCGAGCCAACAAGAAGGGGATGATCGAGACTTTTGGTATTGACAAGGCCGAATACGAATATGGTTT
CGAGACTCGTGTGACGATGTGGATACAGTCCCCCTGGCCTTCTGAGGATATCATCCGGATGATCTCAGCCAAGAAA
GAGGAACCCGACTGGCTTCTCGAGTCCGGCTGAATGCCTATCGGGTATGGAAGACCATGAAGGAGCCCCACTGGGCT
TACTTCGAATATCCCCCATCGACTACCAGGCGCTGACCTACTACAGCGCCCCCGGAGCCTGGCCAAGAACCGGCCG
GCATCGCTGGAGGAGATCGAGCCCGAGATCCGCGACGCCTACAACAAGCTCGGCATCCCCCTCAGGAGCAGGAGCA
CCTCGCGGGTGTGGCCGTGGATACCGTTTGGGACTCGCTGTCCGGTATGACCACCTCCGGTGAAGCTGGCCAAGCA
GGGCATCATTTTTGCTCCATCTCGGAGGCCGTCCGCGAGCATCCCGATCTCGTCCGCAAGTACCTCGCATCGGTGTT
CCGGTGGAGGACAACCTTCTCACGGCCCTCAATAGCGCCGTCTTCTCGGACGGCTCGTTCTGCTACATCCCGCCCCACA
CGCGCTGCCCATGGACCTGTGCACATACTTCAAGAATAAACGCCCAAGACGGGCCAGTTCGAGCGCACCTGCTGA
TTGCCGACGTGGGGGCGACGGTCTCGTACCTGGAGGGCTGCACGGCCCCAAGCGGGACGAGAACCAGCTCCACGCG
GCCGTGGTGCAGCTGGTGGCCCTGGACAACGCCATGATCAAGTACAGCACCGTCCAGAAGTGGTACCCGGGCGACAA
ACAGGGCCGGGGCGGCATCTACAACCTCGTACCAAGCGGGGCCCTGCAAGGGCCACCACAGCCACATCTCATGGAC
CCAGGTGCAGACGGGCTCGCCATCACCTGGAAGTATCCGAGCTGCGTGTCTGCTGGGCGACTACAGCGTGGGCGAGT
TCCACAGCGTGGCCGTGACGAACAACGCCAGCAGGCCGACACGGGCACCAAGATGATCCACATCGGCAAGCACAGC
CGCTCGACGATCGTCTCAAGGGCATCTCGGCCGGCCGACGCGACAACGTCTTCCGGGGCCTGGTCAAGGTGACCCGC
AACGCCGAGGGGGCCCGCAGCCGCTCCCAATGCGACTCGCTGCTGATCGGGGGCCGCTGCGGGGCGCACACCTTCCC
CACGATCGAGTCGCAGAACCCACCTCGGAGTGCAGACGAGGCCTCCACCAGCAAGGTCTCCGAGGAGCAGCTCTT
CTACTGCTCCAGCGCGGCATCAGCCCCGACGATGCCCTCTGCTGATCGTCAACGGCTTTCGGGGCCAGGTATCAAC
CAGTTGCCATGGAATTGCGCGCCGAGGCCACCAAGCTGCTGGGGTCTGCTCTCGAAGGGTCAACTGGCTAACAA...
```

**> Tp\_SufB\_2\_protein**

```
MEPVVKLSTDELVLGDDETEIGVPVENPAAANKKGMIEFTGIDKAEYEGFETRVDDVDVPPGLSEDIIRMISAKKEEPDWL
LEFRLNAYRVWKTMKEPHWAYFEYPPIDYQALTYYSAPRSLAKNRPASLEEIEPEIRDAYNKLGIPLQEQLAGVAVDVTW
DSLVMTTFRSKLAKQGIIFCSISEAVREHPDLVRKYLASVVPVEDNFFALNSAVFSDGSFCYIPPHTRCPMDLSTYFRINAAK
TGQFERTLLIADV GATVSYLEGCTAPKRDENQLHAAVVELVALDNAMIKYSTVQNWYPGDKQGRGGIYNFVTKRGLCKGH
HSHISWTQVETGSAITWKYPSCVLLGDYSVGEFHSAVAVTNNAAQADTGTKMIHIGKHSRSTIVSKGISAGRSNDNFRGLVKV
TRNAEGARSRSQCDSLLIGRCAHTFPTIESQNPTSECEHEASTSKVSEEQLFYCSQRGISPDDALCLIVNGFAGQVINQLP
MEFAAEATKLLGVVLEGSTG*
```

**Primery:**

CATGCAT**ATGGAACCGGTTGTTAAGCTG** Tp-SufB2-NdeIF

TGAC**CTCGAG**GCCAGTTGACCCCTCGAG Tp-SufB2-XhoIR

**Box 3: sekvence TpSufC**

**>Tp\_SufC**

...AAAGCGAGATCAGTTCGGGCACATCGAATGGCAACCCCTGCGCCTCTTCTTCAGATTTCGCAACCTTCAGGCAGAAAGTC  
ACCACTGACCCTCCTCGTCAAATATTAAGGGGATTAACCTGACCGTTCGCCCCGGCGAAGTTCACGCCATCATGGGGC  
CTAACGGCAGCGGCAAGTCCACTCTTGCTTCTGTTCTTTCCGGGGGCGAGTCTTTCCGGCCTACCAGTGGCTCTGTTGA  
GTTTTGTGGTCAGAGCCTCCTCGAGTTGAAACCTGAGGAGCGCGCCATCTCGGTCTTTCATCGTTTTCAATATCCTC  
CTGCAATCCCGGGTGTGCAACGAATACTTCTCCGCACCTCTGTCAATGCCATGCGGCTTGCCCGCGGCCAGCCCAT  
TATGGACGCCCGGAGTTCGAAAGACCCTTGAGAAGAAGATGGGTGAACTGAACTGAGCGAGCGTTTTATGACCC  
GTGGCGTCAATGAGGGCTTCTTGGTGGTGAGAAGAAACGTAATGAGATTCTTCAGATGGCTCTGCTCGAGCCTCGTG  
TTGCCATTCTCGATGAAATTGACTCGGGTCTCGACATCGATGCTCTCAAGTTGTTGCGGACGGTGTGAATATGCTCCG  
ACAGACCCACCCGAGATGGGTCTAGTCTTGATCACCCACTGGCAACGTCTGCTGTCTACATCGTGCCACCCACATC  
CACGTGCTGGCCGAGGGGCGCATCGTGACAGCGGTGGCCCCGAGCTGGCCACAAGTTGGAGGAGAGTGGCTATG  
ACCCCTGGTGCATCCACTCCCGCCCCGGGACCCCGTCCCACCGAACCCACGGGGACGGGGATGCTCCCCCGC  
C...

**> Tp\_SufC\_protein**

...KARSVRHIEWQPPAPLLQIRNLQAEVTTDPPRQILKGINLTVRPGEVHAIMGPNNGSGKSTLASVLSGGSSFRPTSGSVEFCG  
QSLLELKPEERAHLGLFIGFQYPPAIPGVANEYFLRTSVNAMRLARGQPIMDAAEFGKLEKKMGELNLSERFMTRGVNEGF  
SGGEKKRNEILQMALLEPRVAILDEIDSLDIDALKVVADGVNMLRQTHPEMGLVLITHWQRLLSYIVPTHIHVLAEGRIVHS  
GGPELAHKLEESGYDPLVRSTPAPGTPVPTEPTGTGMLPP...

**Box 4: sekvence TpSufS**

**>Tp\_SufS**

...AAGATGCGCCCCTACCAGGCGGGCGGCACATGATCCGCACCGTCTCCTTCAAGGAGAGCACCTTCGCGGCGCTGCC  
CAACCGGCTGGAGGCGGGCACGCCAACATCGAGGGGCGGTGGGCCTGGGGCGGCCATCGACTACATCGAGTCG  
CTGGGCATGGACCGCATCGCCGCTACGAGCGCCGCTGACCCGCTACGCGCTGGCCCGGCTGCGGGAGATCCCCGG  
GGTGCGGGCTCGTGGGCTACGAGGACCTGGTGCGGGACGAGGCCCGGCTGGCCAGGTCGAGAAGGGCTCCCTGCTG  
TCGATCGTCTGCGAGGGCCTCACCCCCACGACCTGGGCACGCTGCTCGACTCGATGGGGGTGGCCCTCCGCTCGGGC  
CACCACTGCGCCATGCCCTCATGGGCTCCTGGGCTCGACGCCACAACCCGCGCATCGTTCTCCTTCTACAACAGCC  
CC...

**> Tp\_SufS\_protein**

...KMRPYQAGGDMIRTVSFKESTFAALPNRLEAGTPNIEGAVGLGAAIDYIESLGMDRIAAYERRLTRYALARLREIPGVRVVG  
YEDLVRDEARLAQVEKGSLLSIVCEGLHPHDLGTLTLLDSMGVALRSGHHCAMPLMGVLGLDATTRASFYNSP...



**Box 5: sekvence MonoSufB**

**>Mono\_SufB\_1**

...AGCAATCATAAAACAAATTTCTACAAAAAAGCACGAACCAGATTGGATGCTCGATTTTCGTCTGAGAGCTTTTCGTGC  
TTGGAAAAGAAATGAAAGAACCTCATTGGGCTTATTTTGATTATCCTCCAGTTAATTATGAAGATCTTGTTTATTATTAG  
CACCAAAATCTGTTGCATCTAATAAACCCAAAAACAATTGATGAAGTTGACATTAACATTCGTCAAACAATGGATAAACTT  
GGAATTCCAATTGATGAGCAAAAGACTTTGGAGAGAGTCAGTGTAGACGTTGTGTGGGATTCTTTTCTGTTTTACTA  
CACAAAAAGAAGAGCTAGCTAAGCTTGAATCATTCTGCTCAATATCTGAAGCTATTGCAGAGCATCCAGACTTGAT  
CAAGAAGTATCTTGCCTCGGTGCTTCCAGTTGAGGACAATTTCTTTTCTGCACTGAACTCTGCTGTGTTCTCTGATGGCT  
CATTCTGCTACATTCCACCATACACCCACTGCCCATTTGATTTGTCAACGTACTTTTCGTATCAATAGTCTGGCACAGGTC  
AATTGAGCGTACATTAGTGATTGCTGATGTTGGAGCAACTGTGTCTTATTTGGAAGGTTGCACCGCACAAAACGTTT  
AGAACATCAGCTGCATGCGGCTGTTGTGGAGCTTGTGGCGCTGGATGAAGCGACAATCAAGTACTCCACTGTGCAGAA  
CTGGTACCCTGGAGACAAAGAAGGCAAAGGAGGCATCTACAACCTTTGTGACAAAGAGAGGGCTGTGTGCAGGGCGA  
AACAGCAGAATAACGTGGACACAAGTGGAGACCGGATCAGCCATCACGTGGAAGTACCCGTCGTGTGTGCTCCGCGG  
GGACGGCAGCTCGGGCGAGTTCCACAGCGTGGCAGTGACGAACAACAGGCAGCAGGCAGACACGGGGACGAAGAT  
GATCCACATTGGCAAGAACACGACATCTACCATTGTGTCGAAGGGGATATCCGCCGGACAGAGCGACAACGTGTACA  
GAGGCATTGTGAAGTTTGCAGCCGGTGCGAAGGGCGCGCAGTGCCACTCGAAATGCGACTCGCTTCTGATTGGGAGC  
GAATGCGGGGGCACACACATTCCCTCTGGCAGAGAGCTCGCAGCCACAGGCAGTCTATGAGCACGAGGCCAGCACGAG  
CAAGATCAGCGAGGAGCAGCTGTTCTTCTGTGCACAGCGCGCATCGATGCAGACGATGCAGTAAATATGATTGTGAA  
TGGCTTTGCAAAGATGTGCTGTCGCT...

**> Mono\_SufB\_1\_protein**

...AIKQISTKKHEPDWMLDFRLRAFRAWKEMKEPHWAYFDYPPVNYEDLVYYSAPKSVASNPKTIDEVDINIRQTMDKLG  
PIDEQKTLERSVVDVWDSLSVFTTQKEELAKLGIIFCSISEAIAEHPDLIKKYLASVVPVEDNFFSALNSAVFSDGSFCYIPPYTH  
CPIDLSTYFRINSAGTGQFERTLVIADVGVATVSYLEGCTAPKRSEHQLHAAVVELVALDEATIKYSTVQNWYPGDKEGKGGIY  
NFVTKRGLCAGRNSRITWTQVETGSAITWKYPSCVLRGDGSSGEFHSVAVTNNRQQADTGTKMIHIGKNTTSTIVSKGISAG  
QSDNVYRGIVKFAAGAKGAQCHSKCDSLIGSECGAHTFPLAESSQPQAVYEHEASTSKISEEQLFCAQRGIDADDAVNMI  
VNGFAKDVLS...

**Box 6: sekvence MonoSufC**

**>Mono\_SufC**

...TGGAGAAGTTCACGCCATCATGGGTCAAATGGTTCAGGGAAAAGCACATTGGCACAAGTTATAGCAGGAATCCATC  
ATTTGTTGTGACTGAAGGTTCAATTTTATTCTGTGGAGAATCTATACTCGAATTGCCACCAGAAGAGCGCGCTCGAATC  
GGAGTTTTTATTGGATTTCAATCGCCTCCAAGCATACTGGGGTATCAAATGAATATTTCTTCGAACTTCAGTTAATGC  
AATTCGCCGTGCAAAAAGTCTTCCAGCACTTGATCCTTCAGAATTTGCTCCTATTCTCGAGCAAAAACGTAAGCAATTGG  
GAATAGACGAATCATTTTTGTCTCGAGGCGTCAATGAAGGTTTTCTGGAGGAGAAAAGAAAAGAAATGAAATCTTAC  
AAATGACCTTGCTGGAACCAAAGCTTTGCCTTTGGATGAAATTGATTCAGGAGTTGATATTGATGCATTGCGTGTTGT  
GACAGAAGGTATCAATGCTCTTAAAGTTCTGAAAGATCGATTGTGATGATCACTCATTGGCAAAGGTTGCTGTCTCAA  
GTTGTTCCAGATAAGGTACACGTCCTATGGGAAGGGCGCATTGTCTGACTGGAGAAAAAGAACTTGCACAGGAACTT  
GAAGAGAAGGGATATGAATGGGTGAAAGAAAAGGCTGTTGCAGAGGGAGTTGTGAAGATTTAATTC...

**> Mono\_SufC\_protein**

...WRSSRHGSKWFREKHIGTSYSRNPFSVVTEGSILFCGESILELPEERARIGVFIGFQSPSPSIPGVSNEYFLRTSVNAIRRAKS  
LPALDPSEFAPILEQKRKQLGIDESFLSRGVNEGFSGGKRRNEILQMTLLEPKLCLLDEIDSGVDIDALRVVTEGINALKGSERS  
IVMITHWQRLLSQVVPDKVHVLWEGRIVLTGEKELAQELEEKGYEWWKEKAVAEVVKI\*

**Box 7: sekvence MonoSufS**

**>Mono\_SufS**

...CACGAGGAAGGAATCAGAATTCTGGGGCATCAGGACGAGATTGTCCAGTCGCAAGCAGAAAAGCCAGCTTCTGCAG  
CTGATTCTATCTGCATCATCAGCATCCTCAGCGTCTCAACATCGTCTTCAAACCTGGATGGAGGAATTTCTCTTTGCGAG  
TCAGCTCCGATCATCTCGTTTGTGTCGCCGTACATCCACTCACACGACTTGGGCACTTTCTCGACAACGAAGGCATCGC  
CACCCGCGGGCGGGCACCCTGCGCCATGCCACTGGCGAAGGCATACGGAATCGATGCATCCACCCGAATCTCCATCTC  
GTTCTACAACACAAAAGAAGAGATCGATGCAACTGTGCGAGCGCTGGAGTCAGTCATGCAGAGGTTGATGTCTGGGAA  
GATAGCAGCATCGACAGCGCTGGAAAGGCACATCTGAAGTCAGCCCCGCTGGCTGCATCGTCCGTGCAGTCTGCATT  
TGCAGCAGGAAGCTCAACTGCTTCACTGCCTGCGCCAAGCGAGTCGGTGGAGGTGTCGTCGCTGTATCAGGAACTGAT  
CATTGAGCACGGGACACACCCACACAACAGCCGCAACAATTGAGCTGACAGCTGAAGAGAACGCAGAAGAGGCACAGC  
GCCCCGGCAGTCTGGTCTCGCTAAAGGAGAAGGATTCAACAGCTTGTGTGGCGATCGGCTGAAGTTTGTATGTGAAG  
CTGCGTCTGCGCGCAAAGGAGAGAGAC...

**> Mono\_SufS\_protein**

...HEEGIRILGHQDEIVQSQAEPASAAADSSASSASSASSTSSSNWMEEFPLCESAPIISFVSPYIHSIDLGLLDNEGIATRGGH  
HCAMPLAKAYGIDASTRISISFYNTKEEIDATVAALSVMQRFMSGKIAASTAPGKAHLKSAPLAASSVQSFAAAGSSTASLPA  
PSESVEVSSLYQELIEHGTHPHNSRTIELTAENAEAAQRPGSLVLAKGEGFNLSLGDRLKFVCEAASARKGER...

### 6.1.2. Rubrerythrin

Dalším proteinem, jehož kódující sekvenci se nám podařilo nově identifikovat v EST datech trimastixe, je peroxidáza rubrerythrin (Rbr). Pravděpodobně máme k dispozici kompletní kódující sekvenci tohoto proteinu (box 8). Navrhli jsme primery s restričními místy NdeI a XhoI tak, aby

výsledný produkt zahrnoval celou sekvenci bez stop-kodónu. Kompletní sekvenci kódující Rbr jsme našli i v EST datech oxymonády *Monocercomonoides* (box 9).

**Box 8: sekvence TpRbr, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

**>Tp\_Rbr**

...AAA**ATGGAGAGCGAAACCGCCAAG**AACCTTCTTGCTGCCTTTGCCGGTGAGTCCCAGGCATTCCAGAAGTACCGCTA  
TTTTGCCGAGATTGCGGAGAAGGCCGCGCCAGCCAATGTTGCCCGTCTTTCCGTGCGACCTCTGCGGCCGAGGGTGT  
TCACATTCGTGCGCTCCTCAACGCCATGATGAAGAACGCCACCACCGAGGGCAACCTCGAGAAGGCTCTTGCTGGTGA  
GACCTATGAGTTCACCGAGATGTACCCTGCCATGGAGGCTGCCGCCAGGCCGAGAACCGCCCCGATGCCAAGTCAT  
CTTACCCAGAACAAGCAGGCCGAGCAGATGCACGCCCGCCACTACCAGGAGGCTCTGGAGGCTCTCCGCCGGGGTG  
TCGATGTCCGGTGCCGGCGTGAAGATCTGGCTGTGCCCTGTTTCCGGTGCCATTGAGTACGGCGCCAACCTCCGGAGC  
GGTGCCCTGTTTGAACGCCCGCGCC**AAGTTCCAGGAGATGCAGTAAGCA**...

**> Tp\_Rbr \_protein**

MESETAKNLLAAFAGESQAFQKYRYFAEIAEKAGQPNVARLFRATSAEAGVHIRLLNAMMKNATTEGNLEKALAGETYEF  
TEMYPAMEAAAQAENRPDAKLIFTQNKQAEQM HARHYQEALRRGV DVGAGVKIWLCPVCGAIEYGANPPPERCPVC  
NAPGAKFQEMQ\*

**Primery:**

CATGC**CATATGGAGAGCGAAACCGCCAAG**

Tp-Rbr-NdeIF

TGAC**CTCGAG**CTGCATCTCCTGGA

Tp-Rbr-XhoIR

**Box 9: sekvence MonoRbr, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

**>Mono\_Rbr**

...AAC**ATGTCTGAAACAGATAAATGC**GTTATGGATGCTTTACTGGTGAATCAAAGCCAGAAACAAGTATACTTTTAC  
GCTGAATTGGCAGAAAAACAGGGACGTCCAAGAATTGCAGCTCTTTCAAAGCTGCAGCACAAGCTGAAGAGATTCAC  
GCTAGAAGATTGTTTAAACATTATGTTGAAGGGAAAAaCATTGGAAGATTGCTTACAAGATGCAATCGATGGGGAGACT  
TATGAATATACTGATATGTATCCACCTTTAAAGCAAAGGCAGAGGCAGAAGGTCGTAAGTCCGAAGCGCGCATTTTT  
GCAAATACCGCTCCAGTTGAAGAGTGCCACTCACAGCGATATAAAGCAGCCTTGAGGAATTGAAGAAGGGAGTTGA  
TCTCGGAGACACAGGACTGAAAGTATTTTTGTGCCAATTTGGATATATTGAAATTGGCACTGATCCACAACAATGT  
CCCGTTTGTAAGCACCTGCAAGT**AAAATGATTGAAGTGAATTAAACT**...

**> Tp\_Rbr \_protein**

MSETDKCVMDAFTGESKARNKYTFYAELAEKQGRPRIAALFKAAAQAEI HARRLFNIMLKGKLTLEDCLQDAIDGETYEYTD  
MYPTFKAKAEAEGRKSEAAIFANTAPVEECHSQRKYKAAL EELKKGVDLGD TGLKVFLCPICGYIEIGTDPQQCPVCKAPASKM  
IEVN\*

**Primery:**

CATGC**CATATGTCTGAAACAGATAAATGC**

Mono-Rbr-NdeIF

TGAC**CTCGAG**ATTCACTTCAATCATTTT

Mono-Rbr-XhoIR

## 6.2. Příprava protilátek a imunologické metody lokalizace proteinů

### 6.2.1. H-protein GCS

Jelikož se v transkriptomu *T. pyriformis* našly transkripty genů kódujících všechny proteiny systému štěpení glycinu (GCS), který je u všech dosud studovaných eukaryot lokalizován v mitochondrii, a jelikož 3 (H-, P1- a T-protein) z těchto 6 transkriptů obsahují N-terminální extenzi, potenciálně představující signální sekvenci pro import do mitochondriální organely, rozhodli jsme se ověřit lokalizaci GCS v buňce trimastixe.

V rámci GCS je klíčovým prvkem H-protein, interaguje totiž se všemi 3 zbylými proteiny: L-, P- i T-proteinem. Navíc, transkript genu kódujícího H-protein u *T. pyriformis*, obsahuje N-terminální extenzi. Proto jsme se zaměřili právě na H-protein (box 10).

**Box 10: sekvence TpGCSH, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

>Tp\_GCSH

```
...CGGAGATCTTCTCAGAAACATTTGAAAAATGCAGCGCCTTTTCTCTGTCGTTCCCGCTGTTGGCCTCTCTTTCCTCGC  
TCGGTTTGCCGGCGAGAAGTTCTACACCAAGGACCACGAGTGGGTTGATGAGTCTGGCCTTGTGGCATTCTGATTAT  
GCCCAGAAGCACCTTGCCAAATTGTGTACGTGACCTTCTGAGATTGGCAAGGAAGTCGCCAGAAGGACACTCTC  
ACTGCCGTGGAGTCCGTGAAGGCCGCTTCGGATGTTTTCGCTCCCGTTCGCCGCACTGTTGAGAAGGTCAATGAGAAG  
CTGCGCGACAATGCCGGCCTTATCAACAAGGCTGCCGAGACTGATGGCTGGATCGCCAAGATCTCCATCAAGGACACT  
GCTGAGTTCGGCACCTCATGAACGCCGAGAAGTACGCCGATTTCCTCAAGACCCAGCATTAAAGAT...
```

>Tp\_GCSH\_protein

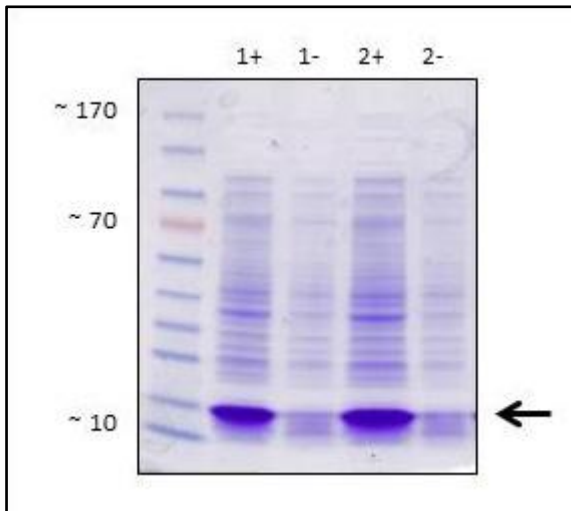
```
...EIFSETFRKMQR LFSVVPVAVGLSFLARFAGEKFYTKDHEWVDESGLVGISDYAQKHLGQIVVYDLPEIGKEVAQKDTLTAVE  
SVKAASDV FAPVAGTVEKVNEKLRDNAGLINKAAETDGWIAKISIKDTAEFGTLMNAEKYADFLKTQH*
```

**Primery:**

CATGCATATGCAGCGCCTTTTCTCTGTC      Tp-H-NdeIF

TGACCTCGAGATGCTGGGTCTTGAGGAA      Tp-H-XhoIR

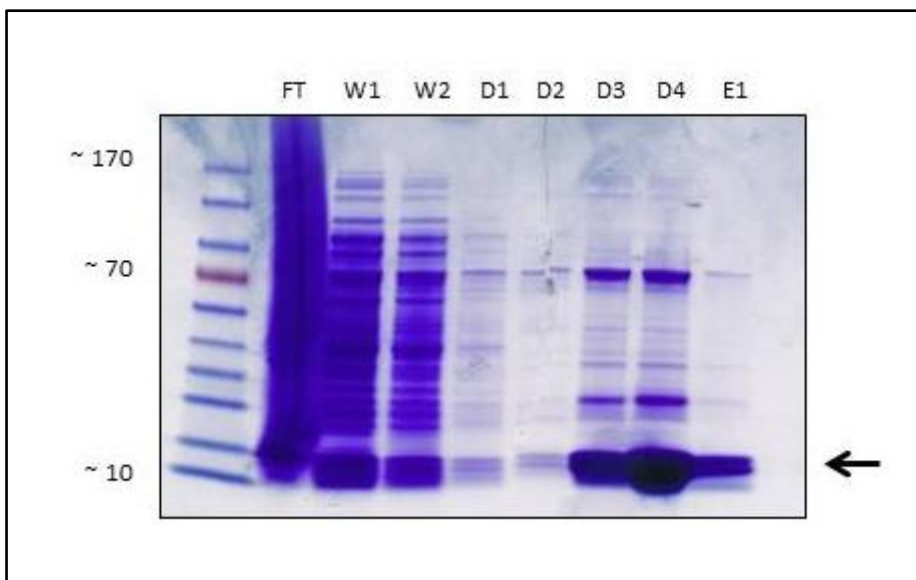
Navrhli jsme primery s restričními místy NdeI a XhoI tak, aby produkt těchto primerů zahrnoval kompletní kódující sekvenci H-proteinu. Sekvenci jsme amplifikovali prostřednictvím PCR a produkt jsme vložili do expresního plazmidu pET42b. Plazmidem, obsahující rekombinantní protein TpGCSH značený 6xHis-tagem, jsme transformovali kompetentní expresní buňky *E. coli* BL21 DE3. Po ověření přítomnosti a správnosti sekvence plazmidu jsme provedli pokusnou expresi 2 kolonií BL21 DE3, u obou s pozitivním výsledkem (obr. 1).



**Obr. 1: pokusná exprese TpGCSH**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **170**, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15 a **10** kDa. **1+)** kolonie 1, exprese indukovaná. **1-)** kolonie 1, neindukovaná kontrola. **2+)** kolonie 2, exprese indukovaná. **2-)** kolonie 2, neindukovaná kontrola. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.

Zvolili jsme kolonii č. 1 a napěstovali ji ve 2 l média. Protein jsme purifikovali za denaturujících podmínek a jednotlivé frakce vymyté z kolony s Ni-NTA agarózou jsme testovali SDS PAGE elektroforézou. Na základě výsledku elektroforézy (obr. 2) jsme zvolili frakci D4 a protein v ní obsažený jsme izolovali pomocí velké vertikální elektroforézy v denaturačním gelu.



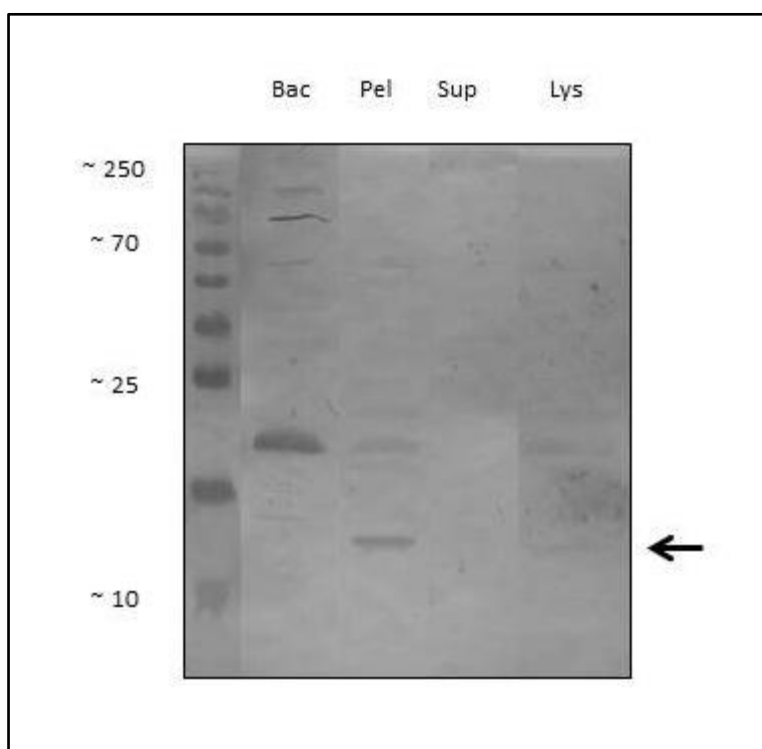
**Obr. 2: purifikace TpGCSH**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **170**, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15 a **10** kDa. **FT)** Flow Through. **W1, W2)** frakce po promytí. **D1 – E1)** eluční frakce. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.

Pruh gelu obsahující protein jsme vyřízli, homogenizovali a uchovávali v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Směsí jsme imunizovali samici laboratorního potkana kmene Wistar od firmy Anlab. Získané sérum obsahující

protilátky proti TpGCSH jsme uchovávali v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sérum jsme použili pro lokalizaci H-proteinu v buňce *T. pyriformis* imunoblotem a imunofluorescencí.

Pro imunoblot jsme připravili frakce kultury *T. pyriformis* jednoduchou frakcionací: 1) bakterie z kultury bez trimastixe, 2) pelet obsahující jádra a membránové organely, 3) supernatant obsahující cytosol trimastixe a 4) celkový lyzát trimastixe. Na membránu s přenesenými proteiny z frakcí jsme aplikovali sérum obsahující primární protilátky a zviditelnili je sekundárními protilátkami značenými alkalickou fosfatázou. Protilátky vytvořily signál odpovídající předpokládané molekulové hmotnosti TpGCSH ve frakci obsahující jádra a membránové organely a ve frakci s celkovým lyzátem *T. pyriformis*. Žádný signál se neobjevil ve frakci s bakteriemi ani ve frakci s cytosolem trimastixe (obr. 3). Z tohoto výsledku imunoblotu je zřejmé, že protilátka rozpoznala protein lokalizovaný výhradně ve frakcích obsahujících membránové organely.

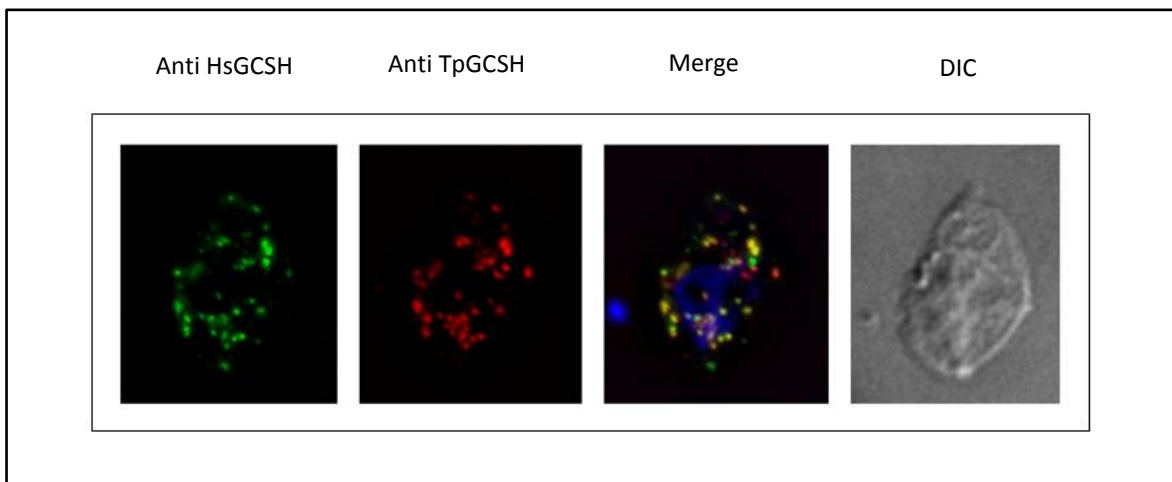


**Obr. 3: imunoblot frakcí trimastixe s protilátkou proti TpGCSH**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **250**, 130, 100, **70**, 55, 35, **25**, 15 a **10** kDa. **Bac**) bakterie z kultury bez trimastixe. **Pel**) pelet obsahující membránové organely *T. pyriformis*. **Sup**) supernatant obsahující cytosol *T. pyriformis*. **Lys**) celkový lyzát *T. pyriformis*. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti TpGCSH. Autor: Mgr. Zuzana Zubáčová, PhD.

Pro imunofluorescenční značení jsme připravili paraformaldehydem fixované preparáty *T. pyriformis* a inkubovali je přes noc jednak se sérem obsahujícím specifické protilátky proti TpGCSH, jednak s komerčně dostupnou protilátkou proti lidskému H-proteinu od firmy Abnova. Protilátky vyprodukované potkanem v našem chovu proti TpGCSH jsme zviditelnili anti-potkaními sekundárními protilátkami značenými červenou fluorescenční značkou AlexaFluor. Komerční protilátku jsme zviditelnili anti-myšími sekundárními protilátkami značenými zelenou fluorescenční značkou AlexaFluor. Signál z obou fluorescenčních značek kolokalizoval v buňkách trimastixe v desítkách diskretních bodů v cytolazmě (obr. 4). Na vlastní aplikaci protilátek

metodou imunoblotu ani imunofluorescenčního barvení se autor této práce nepodílel. Tyto pokusy prováděla Mgr. Zuzana Zubáčová, PhD.



**Obr. 4: imunofluorescenční značení *T. pyriformis* protilátkami proti GCSH**

**Anti HsGCSH**) signál protilátky proti lidskému H-proteinu. **Anti TpGCSH**) signál protilátky proti H-proteinu *T. pyriformis*. **Merge**) Sloučení signálů obou protilátek a signálu barvy Hoechst 33342 značící DNA. **DIC**) diferenciální interferenční kontrast. Autor: Mgr. Zuzana Zubáčová, PhD.

### 6.2.2. Cpn60

Chaperonin 60 (Cpn60) je považován za univerzální mitochondriální marker. Byl dosud nalezen ve všech zkoumaných mitochondriálních organelách a jeho přítomnost je pravděpodobně nezbytná pro nabývání správné konformace u proteinů importovaných do mitochondrie. Proto jsme se rozhodli ověřit lokalizaci i tohoto proteinu. Navrhli jsme primery (box 11) s restrikčními místy NdeI a XhoI tak, aby produkt těchto primerů zahrnoval kompletní kódující sekvenci TpCpn60 a při produkci protilátek jsme postupovali stejně jako v případě H-proteinu. Výsledky pokusné indukce 3 transformovaných kolonií BL21 lze vidět na obr. 5. Vzorky frakcí získaných denaturační purifikací jsou na obr. 6. Pro imunizaci jsme použili frakci E3. Sérum získané z imunizovaného potkana nejevilo žádné známky reakce s frakcemi trimastixie, ani s fixovanými preparáty celých buněk. Imunizace se tedy nezdařila.

**Box 11: sekvence TpCpn60, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

**>Tp\_Cpn60**

```
...AAAATGCAGGCCCTGTTTTCCACTGCTGCCCTGCTCTGGTTCGTCTGGCCTCGTCGGCAAAGGAGATCAAGTTCGGA
GATGAAGGCCGCGCGGCAATTTGAAGGGTGTGACACGCTTGCCAAGGCTGTTGCCACGACCTCGGTCCAAGGG
GCGGACCGTTTTGATTGATGACGAGTTTGAACCCCGCATTACGAAGGATGGTGTACTGTGGCTCGGTTCGATTGATTC
CGTGACAGGTACATGAACGTTGGTGCAAACCTCGTTAAGAACGTTGCCATTAATAACGAAGAGGCAGGCGATGG
TACCACCACGGCCACTGTTCTGGCCACTCCATTTCAAGGAAGGCTGCAAGAGTGTGCCCGCCGCATGAACCCACC
GACCTGAAGCGGGGCATCGACCTGGCCGTGACGCGGTCTGACTGACCTGAAGAAAAAGCCAAACAAATTTCCAC
GAAGGAGGAGCTCAAGCAGGTCGCCACCATCTCCGCAACGGCGACACGAACATCGGTGAGTTTATCGCTCGGCCAT
GGAGCGGGTGGGCAAGGAGGGCATCATCACGGTCGAGGAAGGCAAGAGCACCAAGGACGAGCTGCAGGTGGTGA
GGGTGTCAAGTTTGATCAGGGCTTCGCTCGCCTTCTTCGTGACCGACCAGCACCCATGAAAATGGAGCTCGACGA
CCCCTCATCCTGCTGTGCAACAAGCGCCTCAGCCGGGTGCAGGACGTGGTGGGGCCCATGGACTATGCGCTGAACA
AGATGCATCGGGCGCTGGTCATCGTGGCCGAGGACATCGATGGCGACGCGCTGGCCGTCATGGCTTACAACAAGATC
CGAACGGCGCCAGGGTGTGTCCATCAAGGCCCGGGTTACGGTGAGTCGCGTCGGGCATGGCTGGACGACCTCGC
CCTCTGGGCGGTGGGCAGGTGATCTCGGAGGAAGCAGGCCAGTCCCTGGAACATCCCGAGGCGGCTCTGTTGCT
CGTGTGCAAGGTGATCGCCACCAAGGACTACCCATCCTCCAGGGGGGCGCCGGCAACCAGGAGCTGGTCAAGCGT
CACTGCGAGGGGCTGAAGGAGCAGGCCCGGAACCCGAGCTGAGCGAGTACGACCGGGATCGCTCAAGCAGCGCG
TGGCCAACTCACTGGCGGTGTGGCCGCTCTCAAGGTCGGAGGCGCCTCTGAGGTGGAGGTGGGCGAGAAGAAGGA
CCGGGTCACGGACGCCCTCAACGCCACCAAGGCGGCAGTCGAGGAGGGTGTCTGCCCGGTGGCGGCGCTGCCCTGC
TGCACGCTCGAAGATCCTGCCGGCCATGAAGGCCAAGCTGGACGTCATGGATCAGCGTGTGGGCATCCAGATCATCG
CGGACTCGCTCAAGCAACCTGCCGGCAGATTTGCGAGAACGCGGGTGTGGAGGGTGTGATGGTGGTGGAGCCGCTG
ATGGAGGAGAAGGACGTCAACGTCGGCTACGATGCGCACAACGGCAAGTACTGCCAGATGATCAAGCACGGCATCGT
GGACCCGCTGAAGGTCGTCCGACGGCCCTGGTGGATGCGGCCTCCGTGGCCTCGGTGATGGCCACCTCCGAGGCCG
TCGTGCTCGAGGAGAAGTCCCCCGCCGACAAGGCCGACAAGCCTGCCGGCCTGCCCAAGCCATTCTAAAAA...
```

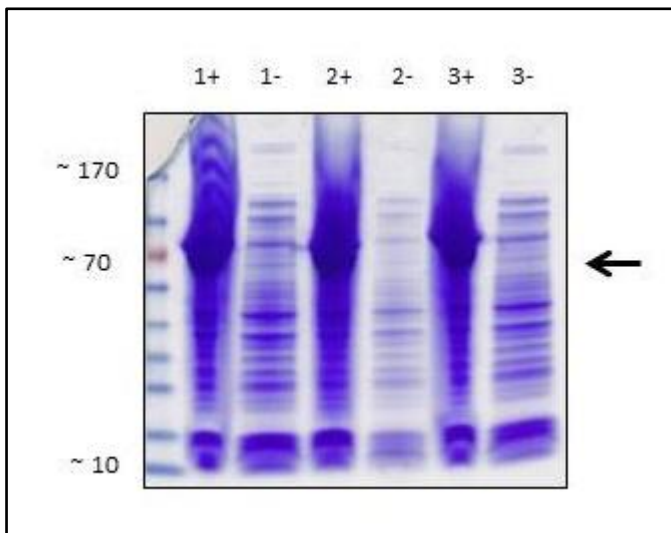
**>Tp\_Cpn60\_protein**

```
MQALFSTAAPALVRLASSAKEIKFGDEGRAAILKGVDTLAKAVATTLGPKGRTVLIDDEFPRITKDGVTVARSIDFRDRYMN
VGANLVKNVAIKTNEEAGDGTATVLAHSIFKEGCKSVAAGMNPTDLKRGIDLAVDAVVDLKKKAKQISTKEELKQVATIS
ANGDTNIGEFIASAMERVGKEGIITVEEGKSTKDELQVVEGVKFDQGFASPPFVTDQHAMKMELEDDPLILLCNKRLSRVQDV
VGPMDYALNKMHRALVIVAEDIDGDALAVMAYNKIRNGARVCAIKAPGYGESRRAWLDDLALLGGGQVISEEAGQSLEHP
EAALFASCRKVIATKDYITLQGGAGNQELVKRHCEGLKEQARNPELSEYDRDLKQRVAKLTGGVAVLKVGGASEVEVGEKK
DRVTDALNATKAAVEEGLVPGGGAALLHASKILPAMKAKLDVMDQRVGIQIIADSLKQPCRQICENAGVEGVMVVSRLME
EKDVNVGYDAHNGKYCQMIKHGIVDPLKVVRTALVDAASVASVMATSEAVVVEEKSPADKADKPAGLPKPF*
```

**Primery:**

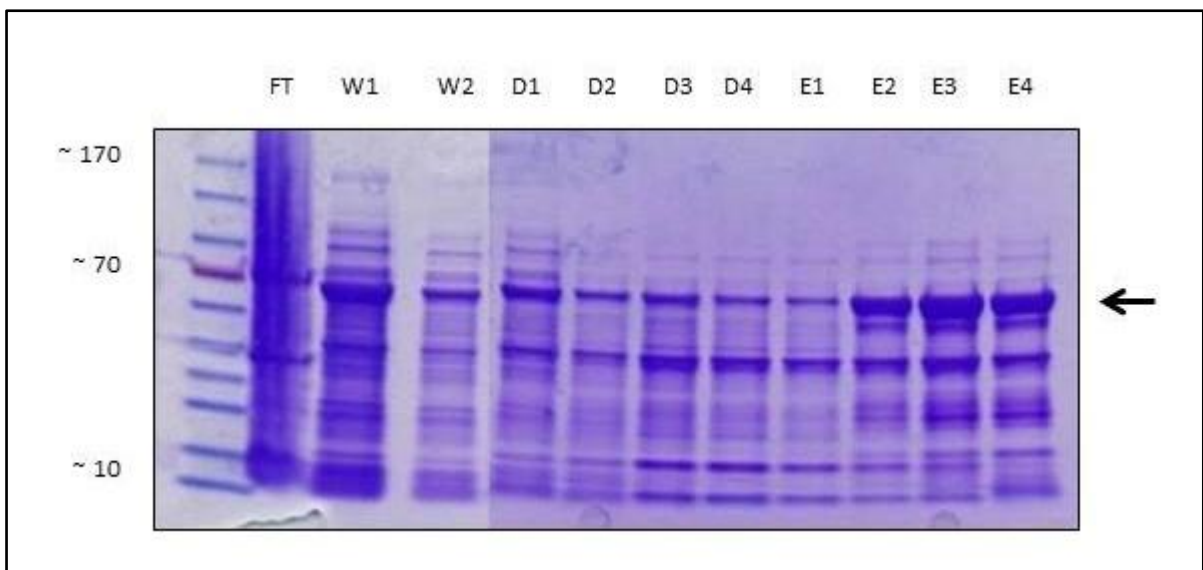
```
CATGCATATGCAGGCCCTGTTTTCCACT    Tp-cpn60-NdeIF
TGACCTCGAGGAATGGCTTGGGCAGGCC    TrimCpn60-XhoIR
```





**Obr. 5: pokusná exprese TpCpn60**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **170**, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15 a **10** kDa. **1+)** kolonie 1, exprese indukována. **1-)** kolonie 1, neindukovaná kontrola. **2+)** kolonie 2, exprese indukována. **2-)** kolonie 2, neindukovaná kontrola. **3+)** kolonie 3, exprese indukována. **3-)** kolonie 3, neindukovaná kontrola. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.



**Obr. 6: purifikace TpCpn60**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **170**, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15 a **10** kDa. **FT)** Flow Through. **W1, W2)** frakce po promytí. **D1 – E4)** eluční frakce. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.

### 6.2.3. Hydrogenáza 2

Abychom ověřili, zda jsou hydrogenázy, jejichž sekvence známe z transkriptomu, lokalizovány v potenciální mitochondriální organelle, rozhodli jsme se též proti nim vytvořit protilátky. Postup přípravy protilátek byl, v čase uzavření této práce, v nejpokročilejším stádiu u hydrogenázy 2, proto je zde uveden právě tento protein. Navrhli jsme primery (box 12) s restričními místy NdeI a XhoI tak, aby výsledný produkt představoval úsek sekvence, ve kterém jsou jednotlivé hydrogenázy trimastixy co nejdivergentnější. Doufáme, že výsledné protilátky budou schopné rozlišit mezi jednotlivými paralogy a ukázat tak jejich případnou rozdílnou lokalizaci v buňce *T. pyriformis*.

**Box 12: sekvence TpHyd2, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

#### >Tp\_hydrogenase2

```
...TCGATGGAGCCCGGCGTTGTGACCAACTTCACCCGCATCGATCGCGAGCTTATCACCTCCGTTGCCCGGGTGTCTCTG
AATGGCGACATTGAGGAGAGCATTGACCGCCTCCCATTAGCTCCACCCCGCAATGAGAAGCCCGCCACTCGTTGCGT
CGCTCCACAAGGAGCGTTCCATCACTAAGTACCGTCTGATGGCTATGATGGGCCACCGCCTTGAGGATGAGACTGATG
AGTCCAAGCCCCTCCGCGCCTATGCCACGAGGCTCTCGCTCGCGATAAGCCCTCCCCAGCCCGGTATGACTGTTAT
CGGCGAGGCTTGCCGTAAGTGCACCCAGAACGCTATTTTCGTACCAACGCCTGCCAGGGTTGCGTTGCTCGCCCTTGC
ATGTGCACCTGCCCAAGAAGGCCATTTCCCGCTCGACGGCCAGGCTAAGATCGATCCCGATCTCTGCGTTGCGTGGC
GCTCTTGCCAGAAGGTGTGCCCTTACCACGCCATCGTGAAGCTCACCGTCCCCTGCGAGGAGGCTTGCCCCGTCGGCG
CTATTGCCAAGGGCGCAACGGCCACGCCGAGATTGACTTCAACAAGTGCATTCACTGCGGCCAGTGCCAGGTGAAGT
GCCCTTCGGCTCGGTCTGGAACCCAGCCAGGTGGTTGATGTCCTGAAGGCCATCAAGGGCGGCAAGCGCGTCATTG
CCATGATCGCCCCGCCATCCTGGCCAACTTCCCCGGCTCGGTGGAGCAGTTCTACAACGCCCTCAAGACCCTCGGGTT
CTGGGACGTGGTGCAGCTCTCCCTGGCCGCTGACCGCGTGGCCGGCATCTCCCTCAAGGCCCTTCTCCACAAGAAG
GAGAAGATCCGCTCTTAAACCCTTGAGTTGCTGAACACGAATCCCGCACCCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA
```

#### >Tp\_hydrogenase2\_protein

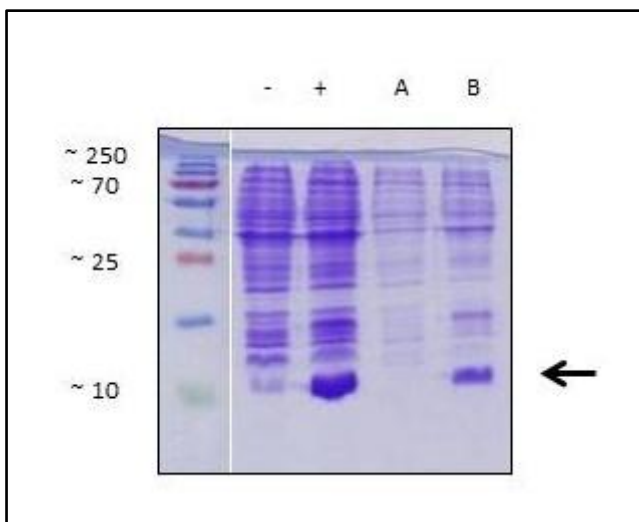
```
MEPGVVTNFTRIDRELITSVARGVNLNGDIEESIDRLPIQLHPRNEKPATRCVHKERSITKYRLMAMMGHRLDEDESKPLR
AYAHEALARDKPFPQPGMTVIGEACRNCTQNAYFVTNACQGCVARPCMSTCPKKAISRVDGQAKIDPDLVRCGSCQKVC
PYHAIVKLTVPCEEACPVGAIAKANGHAEIDFNKCIHCGQCQVKCPFGSVLEPSQVVDVLKAIKGGKRVIAMIAPAILANFP
GSVEQFYNAKLTGLFWDVVDVSLAADRVAGISLKALFLHKKEKIRS*
```

#### Primery:

CATGCATATGGAGCCCGGCGTTGTGACC	Tp-H2ase2-NdeIF
TGACCTCGAGGGAACGCTCCTTGTGGACGCA	Tp-H2ase2-XhoIR

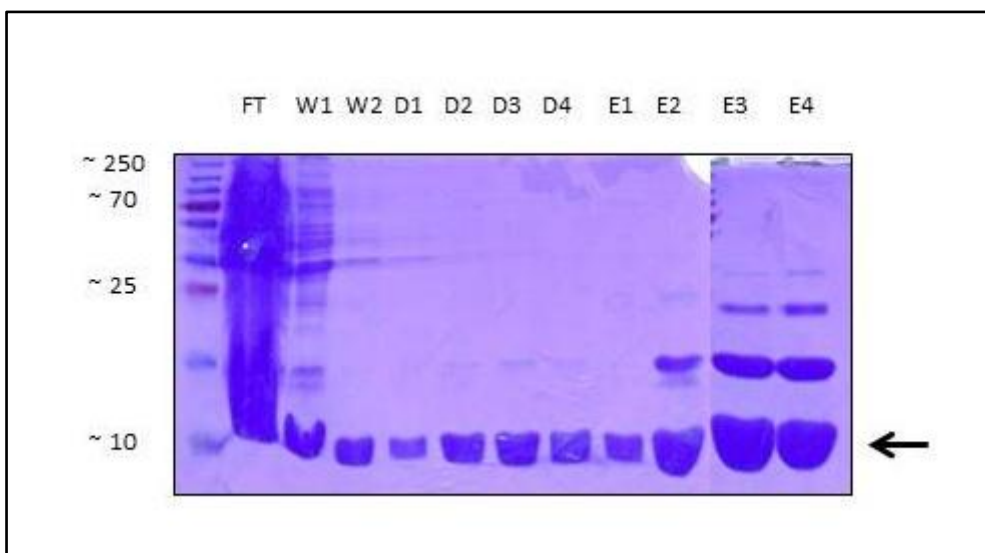
Při přípravě protilátek jsme postupovali obdobně jako v případě TpGCSH a TpCpn60. Při kontrolní indukci jsme provedli test solubility (obr. 7) s tím výsledkem, že peptid se v bakteriích nachází ve formě inkluzních tělísek. Vzorky frakcí získaných denaturační purifikací jsou na obr. 8. Zda se skutečně jedná o žádaný peptid, jsme ověřili analýzou vzorků gelu hmotnostním

spektrometrem 4800 Plus MALDI TOF/TOF (AB SCIEX). Imunizovali jsme laboratorního potkana a imunizaci jsme opakovali 4x v rozestupech 30 dní. Pro 1. a 2. imunizaci jsme použili peptid izolovaný z frakce E1, pro 3. imunizace peptid z frakce E2 a pro 4. peptid z frakce D3. Přesně 10 dní po 3. a 4. imunizaci jsme odebrali vzorek krve a sérum testovali metodou imunoblotu na celkových buněčných lyzátech trimastix. Ani jeden testovaný vzorek nevykázal specifickou aktivitu značící protein o předpokládané velikosti. Imunizaci je tedy nutné opakovat.



**Obr. 7: test solubility Hyd2**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **250**, 130, 100, **70**, 55, 35, **25**, 15 a **10** kDa. -) neindukovaná kontrola. +) indukovaná kontrola. **A)** supernatant. **B)** pelet. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.



**Obr. 8: purifikace TpHyd2**

V levém sloupci je velikostní standard. Jednotlivé pruhy (odshora) označují velikosti: **250**, 130, 100, **70**, 55, 35, **25**, 15 a **10** kDa. **FT)** Flow Through. **W1, W2)** frakce po promytí. **D1 – E4)** eluční frakce. Šipka označuje pozici odpovídající velikosti požadovaného peptidu.

### 6.3. Transformace *S. cerevisiae* geny pro proteiny *T. pyriformis*

Abychom ověřili, zda sekvence hydrogenáz nalezené v transkriptomu *T. pyriformis* obsahují signály pro import do mitochondrie, rozhodli jsme se připravit fúzní geny obsahující co nejdělsí úsek genu původem z trimastixie a fluorescenční značku. Těmito sekvencemi jsme posléze transformovali kvasinky *S. cerevisiae*. Následně jsme fluorescenční mikroskopií ověřovali lokalizaci produktů těchto genů v buňkách kvasinek.

#### 6.3.1. Hydrogenáza 2

Navrhli jsme primery (box 13) s restričními místy XbaI a HindIII tak, aby výsledný produkt zahrnoval téměř celou sekvenci kódující hydrogenázu 2 *T. pyriformis* včetně start-kodónu. Sekvenci jsme amplifikovali PCR a produkt jsme ligovali do vektoru pUG35 obsahujícího sekvenci kódující zelený fluorescenční protein GFP.

**Box 13: sekvence TpHyd2, transformace kvasinek, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

>Tp\_hydrogenase2

```
...TCGATGGAGCCCGGCGTTGTGACCAAACTTCACCCGCATCGATCGCGAGCTTATCACCTCCGTTGCCCGCGGTGTCCTG
AATGGCGACATTGAGGAGAGCATTGACCGCCTCCCATTAGCTCCACCCCGCAATGAGAAGCCCGCCACTCGTTGCT
GCGTCCACAAGGAGCGTTCCATCACTAAGTACCGTCTGATGGCTATGATGGGCCACCGCCTTGAGGATGAGACTGATG
AGTCCAAGCCCCTCCGCGCCTATGCCACGAGGCTCTCGCTCGCGATAAGCCCTTCCCCAGCCCGGTATGACTGTTAT
CGGCGAGGCTTCCGTAAGTGCACCCAGAAGCCTTATTCGTCACCAACGCCTGCCAGGGTTGCGTTGCTCGCCCTTGC
ATGTCGACCTGCCCAAGAAGGCCATTTCCGCGCTGACGGCCAGGCTAAGATCGATCCCGATCTCTGCGTTTCGCTGCG
GCTCTTGCCAGAAGGTGTGCCCTTACCACGCCATCGTGAAGCTCACCGTCCCCTGCGAGGAGGCTTGCCCGTCGGCG
CTATTGCCAAGGGCGCCAACGGCCACGCCGAGATTGACTTCAACAAGTGCATTCCTGCGGCCAGTGCCAGGTGAAGT
GCCCTTCGCGCTCGGTCTTGAACCCAGCCAGGTGGTTGATGTCCTGAAGGCCATCAAGGGCGGCAAGCGCGTCATTG
CCATGATCGCCCCGGCCATCCTGGCCAACCTTCCCCGGCTCGGTGGAGCAGTTCTACAACGCCCTCAAGACCCTCGGGTT
CTGGGACGTGGTCGACGTCTCCCTGGCCGTGACCGCGTGCCCGGCATCTCCCTCAAGGCCCTTCTCTCCACAAGAAG
GAGAAGATCCGCTCTTAACCCTTGAGTTGCTGAACACGAATCCCGCACCCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA
```

>Tp\_hydrogenase2\_protein

```
MEPGVVTNFTRIDRELITSVARGVLNGDIEESIDRLPIQLHPRNEKPATRCVHKERSITKYRLMAMMGHRLDETDESKPLR
AYAHEALARDKPFPPQPGMTVIGEACRNTQNAVFTNACQGCVARPCMSTCPKKAISRVDGQAKIDPDLVRCGSCQKVC
PYHAIVKLTVPCEEACPVGAIKANGHAEIDFNKCIHCGQCQVKCPFGSVLEPSQVVDVLKAIKGGKRVAMIAPAILANFP
GSVEQFYNALKTLGFWDVVDVSLAADRVAGISLKALFLHKKEKIRS*
```

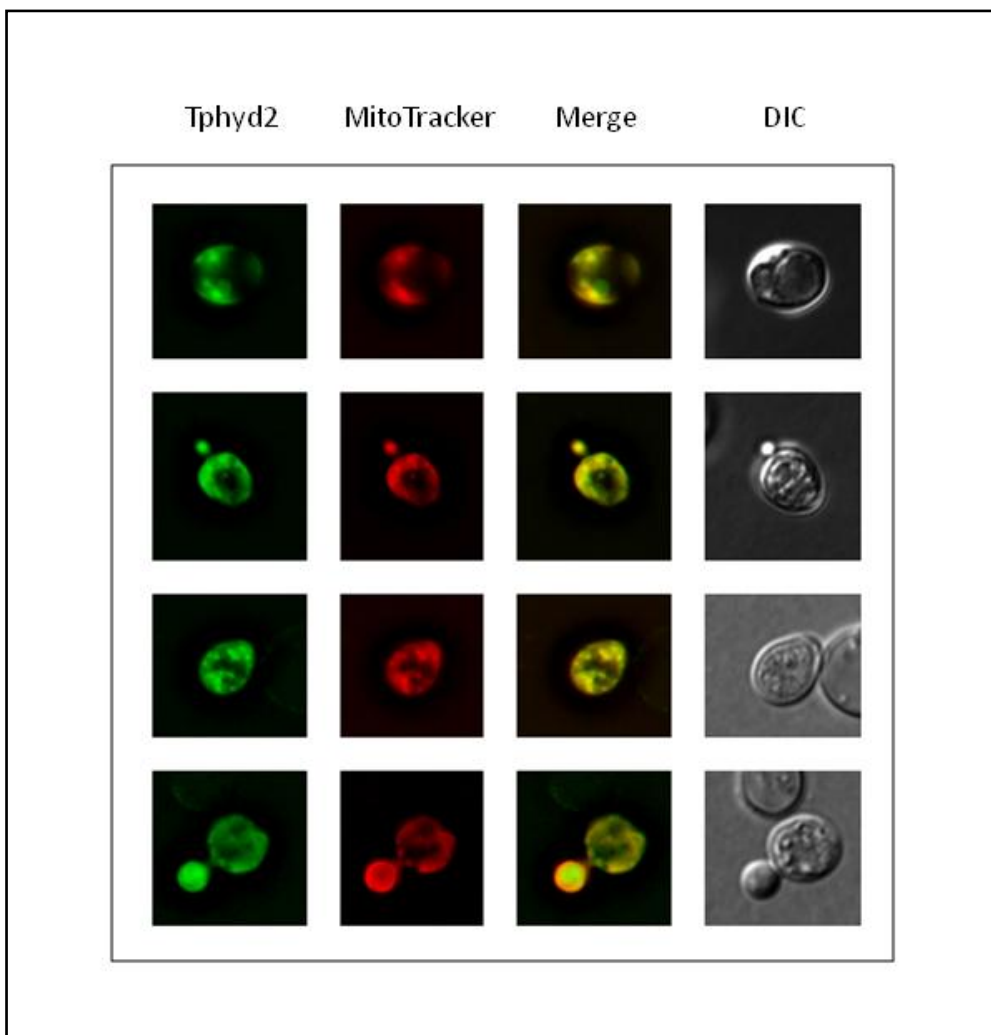
**Primery:**

CATGT**TAG**AATGGAGCCCGGCGTTGTGACC                      Tp-H2ase2-XbaI

TGACA**AAGCT**TGATGCCGGCCACGCGGTCA                      Tp-H2ase2-HindIII

Vektorem se zaklonovaným genem pro hydrogenázu 2 jsme transformovali kvasinky a nechali je 3 dny narůst. Poté jsme z transformovaných kvasinek připravili preparáty značené navíc červenou

fluorescenční značkou MitoTracker specificky rozpoznávající mitochondrie. Preparáty jsme prohlíželi a fotografovali fluorescenčním mikroskopem s použitím GFP a TxRed filtrů (obr. 9). Většina (zhruba 80 %) pozorovaných buněk jevila pouze červený signál označující mitochondriální síť s typickou morfologií. V buňkách, které jevily zároveň červený i zelený signál, nebyla patrná typická mitochondriální síť, což je ovšem při podobných experimentech relativně časté, jelikož exogenní proteiny mohou narušovat funkci a morfologii mitochondrií. Zelený a červený signál ve většině buněk kolokalizovaly. To je konzistentní s hypotézou, že hydrogenáza značená zelenou fluorescenční značkou byla transportována do mitochondrií *S. cerevisiae*.



**Obr. 9: Transformace *S. cerevisiae* hydrogenázou 2 *T. pyriformis***

**TpHyd2)** Signál GFP značící přítomnost hydrogenázy 2. **MitoTracker)** signál barvy specificky značící mitochondrie. **Merge)** Sloučení signálů hydrogenázy 2 a MitoTrackeru. **DIC)** diferenciální interferenční kontrast.

### 6.3.2. Hydrogenáza 3

V případě hydrogenázy 3 jsme postupovali obdobně jako u hydrogenázy 2. Sekvence primerů jsou uvedeny v boxu 14. Výsledky fluorescenční mikroskopie byly též podobné hydrogenáze 2. Zelený signál značící přítomnost hydrogenázy kolokalizoval s červeným signálem označujícím mitochondrie. Stejně jako u hydrogenázy 2 byla morfologie mitochondrií netypická (obr. 10).

**Box 14: sekvence TpHyd3, transformace kvasinek, poloha primerů je vyznačena černými obdélníky.**

#### >Tp\_hydrogenase3

```
...AAAATGGAATCTGGCTGTGTTACTGCTGCCGTTACTTTCGAGCGCGGTCTGATCACCCGTGTTGCCCGTGGTGTGATC
CATGGTGATCTGGAGGATATCGTCAACCGTTCCCATTTGAGGCTCACCCCTAAGGAGGATAAGCAGTCCAGCCGTTGCT
GCCGCCACAAGGATCGTGCCATCACTAAGTATCGTCTCATGGCCATCATGGCCATCGTCTTGAGGATGAGACCGACG
AGGCGAAGCCCCCTCGCTGCTTATGCGCATGAGGCTCTTGCTCGTGAGAAGCCCACCGTTCAGCCCCGGTATGACTGTGCT
GGGTGAGTCTGCCCAACTGCACTCCCGCTGCCTACTTCGTACCAACGCCTGCCAGGGCTGCGTTGCCCGCCTTGC
ATGTCCACCTGCCCTAAGAAGGCCATTTCCCGTGTTGACGGCCAGGCCAAGATCGATCCCGATCTTTCGTTTCGCTGCG
GCGCCTGCCAGAAGGTTTGGCCCTACCACGCCATTGTTAAGCTGGCCGTTCTTTCGAGGAGGCCTGCCCGTTGGCGC
CATTGCCAAGGGTCCCAGCGGCCATGCCGAGATCGACTGGGAGAAGTGCATCCACTGCGGCCAGTGCCAGCTGCAG
GCCCCCTTCTCGTCGGTTCTGGATCCCCTCCAGGTGGTTCGATGTCTGAAGGCCATGAAGGGTGGCAAGCGGGTCTGG
CCATGATCGCCCCGGCCATCTGGCCAACTTCCCGGCTCGGTGGAGCAGTTCTACAACGCCCTCAAGACCTCGGGTT
CTGGGACGTGGTTCGACGTCTCCCTGGCCGCTGACCGCGTGGCCGGCATGGAGTTCGAGGAGTTCGTCGAGCGTGTGC
TCGAGCGCCACGACCCCTGATGACCACCTCGTGTGCCCCGCTACTACCAGGCCGTCAAGAAGCACGTGCCCCAGCT
GTATCAGTACGTCTCCGGGATGCCCTCCCCATGCACATCATGGGTGATATGATTCGGCACCCGTGACCCCGAGGCCCTG
ACCTGCTTCGTTGGCCCTGCCTTGCCAAGCGGGCTGAGGGTCTGGCCCGGACACCATCAACTTCGTCCTGACGGCCA
ACGAGGTCAAGTGCATGCTCGACGCGGGCTCGATCGACGTGACCAAGGCCGCCACCGCCTGGGCGGGCTCCCAGCTG
TTCCCCCAGCAGGCCACCATGCAGGGCACCAACTTCGCCCTGACCCGGGTGTGCCACTGCCGTCTGGCCGCTCTGC
CCTCCGTCTGAAGGACCACGA.GCCCACCACCTCACGCTGAGGCTGCTGCCGCCGCCCGGCCCGCCCGCTCCCGTCCG
CAAGTAATCATCGCCGATGTGAAAACACAGTGGAGGACTAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

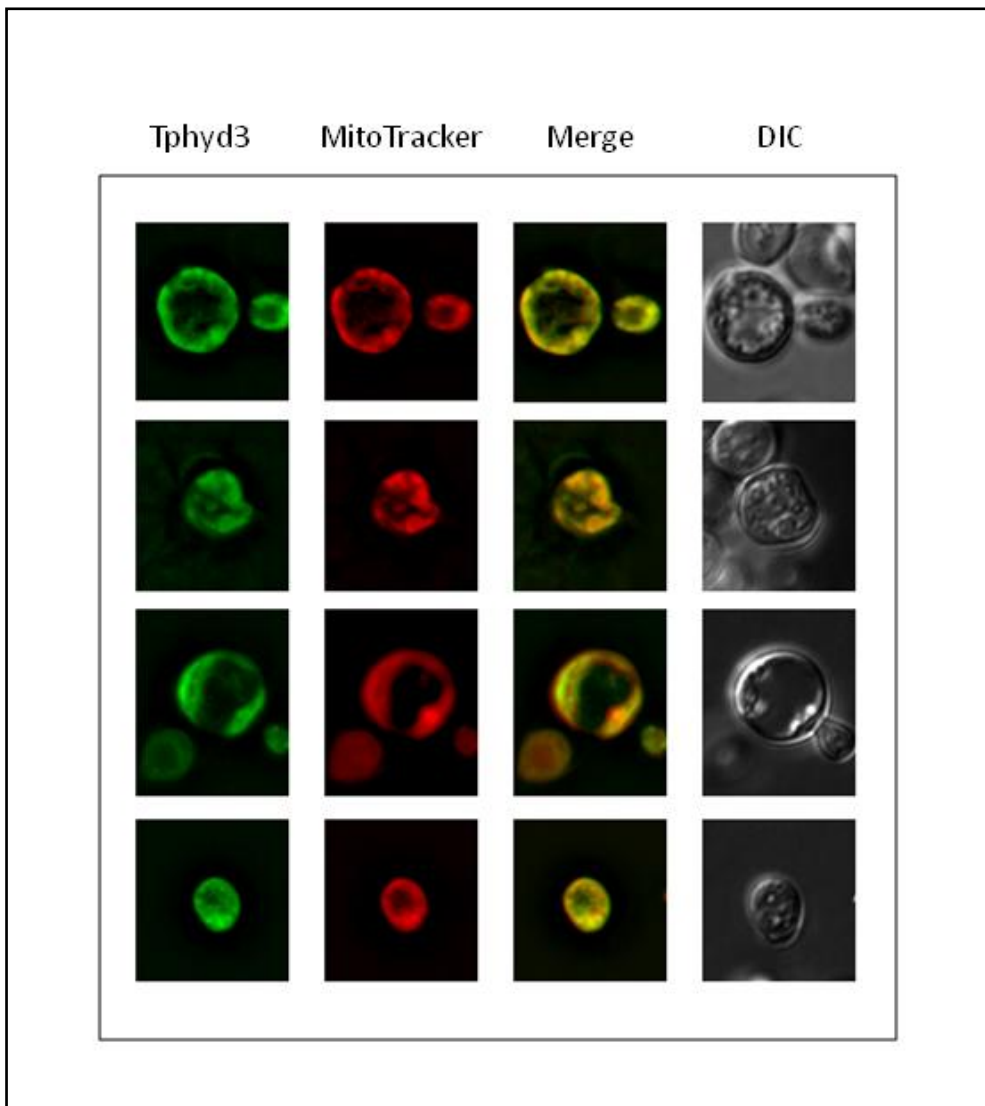
#### >Tp\_hydrogenase3\_protein

```
MESGCVTAAVTFERGLITRVARGVIHGDLEDIVNRFPIEAHPKEDKQSSRCCRHKDRAITKYRLMAIMGHRLEDETDEAKPLA
AYAHEALAREKPTVQPGMTVLGESCNRNCTPAAVFVTNACQGCVARPCMSTCPKKAISRVDGQAKIDPDLVRCGACQKVC
PYHAIVKLAVPCEEACPVGAIKGPSGHAIEIDWEKCIHCGQCQLHCPFSSVLDPLQVVDVLKAMKGGKRVVAMIAPAILANF
PGSVEQFYNALKTLGFWDVVDVSLAADRVAGMECEEFVERVVERHDPLMTTSCCPAYYQAVKKHVPQLYQYVSGMPSPM
HIMGDMIRHRDPEALTCFVGPCLAKRAEGLARDTINFLTANEVKCM LDAGSIDVTKAATAWAGSQLFPQQATMQGTNF
ALTRGVATAVLAALPSVLKDXAHHPHAEAAAAAPAPPAK*
```

#### Primery:

CATGT**CTAGA**ATGGAATCTGGCTGTGTTACTGCT Tp-H2ase3-XbaI

TGACA**AAGCTT**AGAACCGACGAGAAGGGGC Tp-H2ase3-HindIII



**Obr. 10: Transformace *S. cerevisiae* hydrogenázou 3 *T. pyriformis***

**TpHyd2)** Signál GFP značícího přítomnost hydrogenázy 3. **MitoTracker)** signál barvy specificky značící mitochondrie. **Merge)** Sloučení signálů hydrogenázy 3 a MitoTrackeru. **DIC)** diferenciální interferenční kontrast.

## 7. Diskuze

### 7.1.1. SUF systém syntézy FeS center

SUF je jedním ze tří (vedle ISC a NIF) známých systémů syntézy železosírných center. Poprvé byl popsán u *E. coli* (Takahashi & Tokumoto, 2002). U eukaryot byl dosud znám pouze mezi organizmy s plastidem, kde zřejmě pochází z původního sinicového endosymbionta, a v parazitickém stramenopilovi *Blastocystis hominis*, který jej pravděpodobně získal laterálním genovým přenosem z archebakterií (Tsaousis et al., 2012).

Kompletní SUF systém, u prokaryot kódovaný jedním operonem sufABCDSE, sestává ze 6 proteinů: SufA, B, C, D, S a E. Centrální roli v celém systému má cysteinová desulfuráza SufS, která je paralogem IscS. SufS katalyzuje eliminaci síry z L-cysteinu a selenu z L-selenocysteinu (Takahashi & Tokumoto, 2002). Atom síry je dále transportován na SufE, který tak drasticky zvyšuje desulfurázovou aktivitu SufS (Ollagnier-de-Choudens et al., 2003). Proteiny SufB, C a D tvoří fyzický komplex o stechiometrii 1:2:1 (B:C:D), který představuje „lešení“ pro sestavení FeS centra a jeho transport na cílový apoprotein (Wollers et al., 2010). U druhů prokaryot, které exprimují jak ISC, tak SUF systémy, se ukázalo, že SUF systém hraje velkou roli za podmínek oxidačního stresu, kdy přebírá některé funkce ISC (Outten et al., 2004).

V transkriptomu *T. pyriformis* jsme identifikovali 4 geny kódující proteiny SUF systému: 2 homology SufB, SufC a SufS. Sekvenčně podobné geny pro SufB, C a S jsme našli i u blízké příbuzné oxymonády rodu *Monocercomonoides*. Fakt, že byly sekvence nalezeny v transkriptomech ovšem nemůže být pokládán za důkaz jejich přítomnosti v genomech daných organismů. Nelze totiž zanedbat možnost, že jde o kontaminaci z prokaryot žijících v kulturách, ve kterých jsou oba prvoci pěstováni. Pravděpodobnost, že jde skutečně o eukaryotické geny, zvyšuje fakt, že *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. jsou kultivováni za odlišných podmínek v médiích o odlišných složeních a s odlišným druhovým složením polyxenických kultur. Tento argument je ovšem možné považovat za relevantní pouze v případě, že homologické sekvence z trimastixe a *monocercomonoida* se ukáží být skutečně blízké příbuzné. Výsledky dosavadních fylogenetických analýz tomu skutečně dávají za pravdu. Jedna ze sekvencí SufB trimastixe a SufB *monocercomonoida* se větví sestersky s vyloučením všech prokaryot i eukaryot. Totéž platí pro SufC a SufS (Vacek, osobní sdělení).

Dále je třeba provést lokalizační pokusy. Jednak metodou *in situ* fluorescenční hybridizace (FISH), která ukáže, zda se dané geny nacházejí v jádrech prvoků, či v bakteriích. Jednak imunologické lokalizační pokusy odhalující lokalizaci proteinových produktů těchto genů v buňkách. Až na základě těchto pokusů bude možné definitivně prohlásit, že *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. obsahují geny pro komponenty SUF systému.

Další otázkou, která se SUF systémem úzce souvisí, je domnělá nepřítomnost genů pro typický mitochondriální ISC systém. V transkriptomických datech trimastixe ani *monocercomonoida* se dosud nepodařilo nalézt ani jedinou sekvenci kódující protein tohoto systému. Prokázat nepřítomnost nějakého genu či buněčného systému je ovšem pochopitelně výrazně obtížnější, než



prokázat jeho přítomnost. Za relativně definitivní potvrzení nepřítomnosti ISC systému u trimastixe bude možné považovat až jeho nepřítomnost v osekvenovaném genomu.

Předpokládejme ovšem, že tomu tak skutečně je, že *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. exprimují funkční SUF systém a zcela jim chybí systém ISC. Proteiny SUF systému u obou prvoků nejeví žádnou specifickou příbuznost homologickým sekvencím pocházejícím z fotosyntetických eukaryot, ani z *B. hominis* (Vacek, osobní sdělení). Jejich přítomnost u Preaxostyla tedy nelze považovat za doklad jakékoli příbuznosti k jiným skupinám eukaryot, či dokonce dávné přítomnosti plastidu. Je naopak velmi pravděpodobné, že společný předek *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. získal SUF systém laterálním genovým přenosem z prokaryot, obdobně jako *B. hominis*.

Dále, pokud *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. skutečně nemají ISC systém, pak jsou jedinými takovými eukaryoty, s výjimkou *M. balamuthii* a *E. histolytica*. Tyto dvě měňavky pravděpodobně ztratily ISC systém v návaznosti na získání dvou proteinů systému NIF laterálním genovým přenosem (viz kapitola 3.9.3). Můžeme tedy vyslovit analogickou hypotézu, že u Preaxostyla byl ISC systém funkčně nahrazen SUF systémem. U *M. balamuthii* (a s výrazně menší jistotou i *E. histolytica*) jeví NIF systém duální lokalizaci v cytosolu a redukované mitochondrii (Nývltová et al., 2013). O buněčné lokalizaci SUF systému u *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. nemáme dosud žádné indicie a tuto otázku rozřeší až budoucí lokalizační experimenty. Je ovšem pozoruhodné, že v každé dosud studované mitochondriální organelle byla nějaká forma systému syntézy FeS center objevena (možná snad s výjimkou *E. histolytica*, kde je mitozomální lokalizace NIF systému sporná). Tyto systémy tedy patrně hrají klíčovou, ne-li esenciální roli v mitochondrii, nehledě na stupeň její redukovatosti. Pokud se prokáže mitochondriální lokalizace SUF systému u *T. pyriformis*, půjde o další podpoření této hypotézy. Ještě pozoruhodnější by ovšem bylo, kdyby mitochondriální organela *T. pyriformis* systém syntézy FeS center postrádala.

Dále je zde otázka předpokládané sekundární amitochondriality *Monocercomonoides* sp., případně všech oxymonád (a zde opět vyvstává problém s obtížným prokazováním nepřítomnosti konkrétního buněčného systému. Určitou jistotu budeme mít teprve, až bude k dispozici co nejkompletnější osekvenovaný genom monocercomonoida). Pokud oxymonády (nebo alespoň někteří jejich zástupci) skutečně mitochondrii ztratily, tak jde velmi unikátní jev mezi eukaryoty a je na místě ptát se po příčinách této ztráty. Co umožnilo ztrátu organely, která se u ostatních studovaných eukaryot zdá být nezbytnou?

Nemůže to souviset právě s exogenním systémem syntézy FeS center? U *B. hominis* jsou komponenty SUF systému (ve skutečnosti fúzní protein SufBC) lokalizovány v cytosolu (Tsaousis et al., 2012), zatímco v redukované mitochondrii je lokalizován typický mitochondriální ISC systém (Stechmann et al., 2008). Tato redundance může mít fyziologickou úlohu při přenosu *B. hominis* mezi hostiteli vnějším prostředím bohatým na kyslík. Experimenty totiž ukázaly silně zvýšenou expresi SufBC v buňkách *B. hominis* vystavených oxidačnímu stresu (Tsaousis et al., 2012), což je konzistentní s rolí SUF systému při oxidačním stresu u bakterií. U *B. hominis* tedy mohl být laterálně přenesený SUF systém zachován díky selekční výhodě, kterou pro tento anaerobní organizmus představuje v aerobním prostředí. Zřejmě ale existuje i selekční tlak pro zachování ISC systému v mitochondriální organelle. Jak *T. pyriformis*, tak *Monocercomonoides* sp. jsou

mikroaerofilní, ne striktně anaerobní organizmy. Z toho důvodu se zdá logickou hypotéza, že i v jejich případě k zafixování SUF systému vedla adaptace na oxidační stres.

Zde se tedy nabízí příležitost pro srovnání zástupců *Preaxostyla* s *B. hominis*. Pokud *T. pyriformis* a *Monocercomonoides* sp. skutečně zcela nahradili svůj ISC systém SUF systémem, jaký je onen selekční tlak, který u nich chybí a naopak u *B. hominis* je natolik významný, že si vyžádal zachování dvou redundantních buněčných systémů? A pokud *Monocercomonoides* sp. opravdu ztratil mitochondriální organelu, může to souviset se ztrátou ISC systému v ní lokalizovaného?

### 7.1.2. Rubrerythrin

Jak jsme zmínili v kapitole 3.9.1 o hydrogenozomu *T. vaginalis*, rubrerythrin (Rbr) je peroxidáza, tedy enzym přeměňující vysoce reaktivní peroxid vodíku na vodu. Může tedy mít úlohu v reakci na oxidační stres. U *T. vaginalis* je Rbr lokalizován v hydrogenozomu, je tedy pro nás zajímavý coby potenciální protein mitochondriální organely trimastixe.

V případě Rbr je nutná stejná opatrnost jako u proteinů SUF systému. To, že jsme jeho kódující sekvenci našli v transkriptech trimastixe i monocercomonoida nelze považovat za důkaz jejich přítomnosti v genomech těchto organizmů. O buněčné lokalizaci daných proteinů nemluvě.

### 7.1.3. Systém štěpení glycinu

V transkriptomu *T. pyriformis* byly identifikovány sekvence genů kódujících všechny komponenty systému štěpení glycinu, tedy proteiny H, L, T a podjednotky P1 a P2. Zajímavé je, že GCS trimastixe je zřejmě chimérického původu, kdy proteiny L a T pocházejí od eukaryotických předků *T. pyriformis*, zatímco proteiny P1, P2 a pravděpodobně i H byly do genomu trimastixe laterálně přeneseny z bakterií (viz kapitola 3.7.2.1, Hampl et al., 2008).

Výsledky našich experimentů, uvedené v této práci, nejsou definitivním dokladem přítomnosti H-proteinu v mitochondriální organelle *T. pyriformis*, pouze zvyšují pravděpodobnost takové lokalizace. Immunoblot frakcí *T. pyriformis* s protilátkou proti TpGCSH je dokladem lokalizace tohoto proteinu v membránových organelách obecně. Imunofluorescenční mikroskopie, která ukázala kolokalizaci naší protilátky proti TpGCSH s protilátkou proti lidskému GCSH, pak dokládá lokalizaci H-proteinu v drobných váčcích v cytoplazmě. Na základě těchto informací ovšem není možné váčky obsahující H-protein prohlásit za mitochondriální organely.

Definitivní doklad mitochondriální lokalizace H-proteinu poskytly až pozdější imunoelektronmikroskopické pokusy metodou ImmunoGold. Ty ukázaly lokalizaci naší protilátky proti TpGCSH do dvojmembránových organel o stejném vzhledu jako dříve identifikované potenciální mitochondriální organely (Zubáčová, osobní sdělení).

Další doklady mitochondriální lokalizace GCS u trimastixe poskytly experimenty s transformací kvasinek. Fluorescenčně značené proteiny H a P1 byly transportovány do mitochondrií *S. cerevisiae*. Jako negativní kontrola posloužil H-protein *T. pyriformis* s odstraněnou N-terminální extenzí. Ten nebyl buňkou *S. cerevisiae* rozpoznán jako mitochondriální protein a fluorescenční mikroskopie ukázala jeho lokalizaci v cytosolu (Zubáčová et al., 2013).

Na základě těchto výsledků tedy můžeme prohlásit, že mitochondriální organela *T. pyriformis* pravděpodobně obsahuje kompletní systém štěpení glycinu a metabolismus této aminokyseliny je tak její první jednoznačně identifikovanou funkcí.

#### 7.1.4. Hydrogenázy

Pro úvahy o funkci mitochondriální organely *T. pyriformis* je zásadní zjistit, zda má úlohu v energetickém metabolismu buňky. Vzhledem k tomu, že podezřelé dvojmembránové organely na elektronmikroskopických snímcích nejvíce připomínají hydrogenozomy, je nasnadě se ptát, zda jsou v nich lokalizovány [FeFe]hydrogenázy, jejichž kódující sekvence byly nalezeny v transkriptomech trimastixe.

Z toho důvodu jsme započali práci na přípravě protilátek proti jednotlivým hydrogenázám a to takovým způsobem, aby byly pokud možno schopné rozeznávat mezi jednotlivými paralogy těchto proteinů. Je totiž možné, že různé paralogy mají odlišnou buněčnou lokalizaci. Práce na přípravě protilátek se dosud neschly.

Dále jsme provedli experimenty s transformací *S. cerevisiae* geny pro fluorescenčně značené proteiny hydrogenáza 2 a hydrogenáza 3 původem z trimastixe. Těmito pokusy jsme měli v úmyslu zjistit, zda primární struktura daných proteinů obsahuje signální sekvence pro import do mitochondrie.

Výsledky transformačních experimentů jsou nejednoznačné. Fluorescenční mikroskopie sice ukázala kolokalizaci signálu ze značených proteinů *T. pyriformis* se signálem barvy specificky značící mitochondrie, ale úspěšně transformované buňky *S. cerevisiae* jevíly značně pozměněnou morfologií. Především v nich, na rozdíl od buněk obarvených pouze MitoTrackerem, nebyla patrná typická mitochondriální síť.

Proto se obáváme, že výsledky těchto pokusů představují artefakty a nemůžeme je považovat za doklady buněčné lokalizace daných proteinů. Abychom ověřili, zda jsou pozorované kvasinky skutečně úspěšně transformované fluorescenčně značenými proteiny trimastixe, testovali jsme vzorky domněle transformovaných kvasinek imunoblotem s protilátkou proti GFP. Tyto pokusy zatím u žádné kultury kvasinek neukázaly pozitivní výsledek. Proto nemůžeme brát výsledky fluorescenční mikroskopie těchto kultur za signifikantní a transformaci je nutné opakovat.

## 8. Závěry

- 1) V transkriptomu *T. pyriformis* jsme identifikovali sekvence kódující proteiny SufB, SufC, SufS a Rubrerythin. Homology všech 4 sekvencí byly nalezeny i v transkriptomu *Monocercomonoides* sp.
- 2) Vytvořili jsme protilátku proti H-proteinu GCS trimastixe. Tato protilátka kolokalizuje s komerčně dostupnou protilátkou proti lidskému H-proteinu v diskretních bodech v cytoplazmě trimastixe. Na imunoblotu tato protilátka rozpoznává protein o velikosti odpovídající H-proteinu ve frakci obsahující mitochondriální organely *T. pyriformis* a nic nerozpoznává ve frakci obsahující cytosol *T. pyriformis*.
- 3) Lokalizace hydrogenázy 2 a hydrogenázy 3 *T. pyriformis* vnesených do buněk *S. cerevisiae* poskytla nejednoznačné výsledky a bude nutné ji opakovat.

## 9. Seznam použitých zkratek

AAT	aspartát aminotransferáza
ADI	arginin deimináza
ADP	adenosin difosfát
AK	adenylátkináza
Ala	alanin
ALT	alanin aminotransferáza
APSK	APS kináza
AS	ATP sulfuryláza
ASCT	acetyl:sukcinát CoA-transferáza
Asp	kyselina asparagová
ATCC	american type culture collection
ATP	adenosin trifosfát
BLAST	basic local alignment search tool
CBB	coomasie brilliant blue
CK	karbamoyl kinázy
CoA	koenzym A
Cpn	chaperonin
CS	cystein syntáza
Cys	cystein
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DIC	diferenciální interferenční kontrast
EGTA	ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EST	expressed sequence tag
FBA	fruktózabisfosfátaldoláza
Fdx	ferredoxin
FeS	železosirný
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FNR	ferredoxin:NADP <sup>+</sup> reduktáza
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
GCS	system štěpení glycinu
GCSH	H-protein GCS
GDH	glutamát dehydrogenáza
GFP	zelený fluorescenční protein
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
GPI	fosfoglukoizomeráza
HCP	hybrid cluster protein
HsGCSH	H-protein GCS <i>Homo sapiens</i>
Hsp	protein teplotního šoku
Hyd	[FeFe]hydrogenáza
HydE	maturáza hydrogenáz E
HydF	maturáza hydrogenáz F

HydG	maturáza hydrogenáz G
IgG	imunoglobulin G
IPP	anorganická pyrofosfatáza
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
ISC	iron-sulfur cluster system
LB	lysogeny broth - lyzogení vývar
LiAc	octan lithný
MC	mitochondriální přenašeče
MCF	mitochondrial carrier family
MCF	rodina mitochondriálních přenašečů
MGL	metionin- $\gamma$ -lyáza
Mono	<i>Monocercomonoides</i> sp.
MPP	mitochondriální procesující peptidáza
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
Ndh	adenin dinukleotid dehydrogenáza
NIF	nitrogen-fixation system
OD	optická denzita
OTC	ornitin transkarbamyláza
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAM/Pam	presequence translocase-associated motor
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PFO	pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
PGAM	fosfoglycerátmutáza
PGK	fosfoglycerátkináza
PIPES	kyselina piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová)
PK	pyruvátkináza
PNT	pyridin-nukleotid transhydrogenáza
PPDK	pyruvátfosfátkináza
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
PSAT	fosfoserin aminotransferáza
Rbr	rubrerythrin
RPM	rotation per minute - otáček za minutu
SAM/Sam	sorting and assembly machinery
SCS	sukcinátthiokináza
SDS	dodecylsírán sodný
Ser	serin
SHMT	serin hydroxymetyltransferáza
SOC	super optimal broth
SSD	DNA z lososích spermíí
SUF	mobilization of sulfur system
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	tetrametyletylendiamin
TIM/Tim	translokáza přes vnitřní membránu

TOM/Tom	translokáza přes vnější membránu
Tp	<i>Trimastix pyriformis</i>
TpGCSH	H-protein GCS <i>T. pyriformis</i>
TPI	triózafosfátizomeráza
TRX	thioredoxinová dráha
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 10. Seznam použité literatury

1. Abrahamsen, M. S. *et al.* Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 441–5 (2004).
2. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y. & Nozaki, T. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *The Journal of biological chemistry* **279**, 16863–74 (2004).
3. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403–10 (1990).
4. Bernard, C., Simpson, A. G. B. & Patterson, D. J. Some free-living flagellates (protista) from anoxic habitats. *Ophelia* **52**, 113–142 (2000).
5. Brugerolle, G. & Patterson, D. Ultrastructure of *Trimastix convexa hollande*, an amitochondriate anaerobic flagellate with a previously undescribed organization. *European Journal of Protistology* **33**, 121–130 (1997).
6. Carlton, J. M. *et al.* Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science (New York, N.Y.)* **315**, 207–12 (2007).
7. Dacks, J. B. *et al.* Oxymonads Are Closely Related to the Excavate Taxon *Trimastix*. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1034–1044 (2001).
8. Danovaro, R. *et al.* The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC biology* **8**, 30 (2010).
9. Dolezal, P. *et al.* The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens* **6**, e1000812 (2010).
10. Dolezal, P. *et al.* Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic cell* **6**, 1431–8 (2007).
11. Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M. & Rébeillé, F. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**, 167–176 (2001).
12. Dyall, S. D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **278**, 30548–61 (2003).
13. Froger, A. & Hall, J. E. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE* 253 (2007). doi:10.3791/253
14. Fujiwara, K. Synthesis and Characterization of Selenolipoylated H-protein of the Glycine Cleavage System. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19880–19883 (1997).



15. Gelius-Dietrich, G., Ter Braak, M. & Henze, K. Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **54**, 42–4 (2007).
16. Gill, E. E. *et al.* Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Molecular microbiology* **66**, 1306–20 (2007).
17. Goldberg, A. V *et al.* Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**, 624–8 (2008).
18. Guda, P., Guda, C. & Subramaniam, S. Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **5**, 166–76 (2007).
19. Hampl, V. *et al.* Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PloS one* **3**, e1383 (2008).
20. Hampl, V. *et al.* Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3859–64 (2009).
21. Hollande, A in Grassé, P. P. (1952), citováno podle Bernard, C., Simpson, A. G. B. & Patterson, D. J. Some free-living flagellates (protista) from anoxic habitats. *Ophelia* **52**, 113–142 (2000).
22. Hrdý, I. & Müller, M. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Journal of molecular evolution* **41**, 388–96 (1995).
23. Hug, L. A., Stechmann, A. & Roger, A. J. Phylogenetic distributions and histories of proteins involved in anaerobic pyruvate metabolism in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* **27**, 311–24 (2010).
24. Jedelský, P. L. *et al.* The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PloS one* **6**, e17285 (2011).
25. Katinka, M. D. *et al.* Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**, 450–3 (2001).
26. Kent, W. S. *Manual Of The Infusoria Vol-I.* (David Bogue; London, 1882).
27. Klebs, G. Flagellatenstudien. *Zeitschrift für wissenschaftlichen Zoologie* (1893).
28. Kozjak, V. *et al.* An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *The Journal of biological chemistry* **278**, 48520–3 (2003).
29. Kunji, E. R. S. The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS letters* **564**, 239–44 (2004).
30. Lill, R. *et al.* Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta* **1763**, 652–67 (2006).

31. Luciano, P. & Géli, V. The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**, 1077–82 (1996).
32. Maralikova, B. *et al.* Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cellular microbiology* **12**, 331–42 (2010).
33. Mentel, M., Zimorski, V., Haferkamp, P., Martin, W. & Henze, K. Protein import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* involves both N-terminal and internal targeting signals: a case study of thioredoxin reductases. *Eukaryotic cell* **7**, 1750–7 (2008).
34. Mertens, E. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Letters* **285**, 1–5 (1991).
35. Mi-ichi, F., Abu Yousuf, M., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 21731–6 (2009).
36. Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D. & Nozaki, T. Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS neglected tropical diseases* **5**, e1263 (2011).
37. Millet, C. O. M. *et al.* Mitochondria-derived organelles in the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens*. *Experimental parasitology* **null**, (2013).
38. Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J. & Lill, R. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *The Journal of biological chemistry* **277**, 29810–6 (2002).
39. Mukherjee, M., Brown, M. T., McArthur, A. G. & Johnson, P. J. Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic cell* **5**, 2062–71 (2006).
40. Müller, M. *et al.* Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **76**, 444–95 (2012).
41. Nývltová, E. *et al.* NIF-type iron-sulfur cluster assembly system is duplicated and distributed in the mitochondria and cytosol of *Mastigamoeba balamuthi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7371–6 (2013).
42. O’Kelly, C. J., Farmer, M. A. & Nerad, T. A. Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard *et al.*: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist* **150**, 149–62 (1999).
43. Ollagnier-de-Choudens, S. *et al.* Mechanistic studies of the SufS–SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE. *FEBS Letters* **555**, 263–267 (2003).
44. Outten, F. W., Djaman, O. & Storz, G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **52**, 861–72 (2004).
45. Patron, N. J., Durnford, D. G. & Kopriva, S. Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC evolutionary biology* **8**, 39 (2008).

46. Posewitz, M. C. *et al.* Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *The Journal of biological chemistry* **279**, 25711–20 (2004).
47. Pütz, S. *et al.* Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic cell* **5**, 579–86 (2006).
48. Rada, P. *et al.* The Core Components of Organelle Biogenesis and Membrane Transport in the Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE* **6**, e24428 (2011).
49. Reeves, R. E., Warren, L. G., Susskind, B. & Lo, H. S. An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J. Biol. Chem.* **252**, 726–731 (1977).
50. Regoes, A. *et al.* Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *The Journal of biological chemistry* **280**, 30557–63 (2005).
51. Riordan, C. E., Langreth, S. G., Sanchez, L. B., Kayser, O. & Keithly, J. S. Preliminary evidence for a mitochondrion in *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *The Journal of eukaryotic microbiology* **46**, 52S–55S (1999).
52. Roger, A. J. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 14618–14622 (1996).
53. Schneider, R. E. *et al.* The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *International journal for parasitology* **41**, 1421–34 (2011).
54. Simpson, A. G. B. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1759–1777 (2003).
55. Simpson, A. G. B., Radek, R., Dacks, J. B. & O’Kelly, C. J. How oxymonads lost their groove: an ultrastructural comparison of *Monocercomonoides* and excavate taxa. *The Journal of eukaryotic microbiology* **49**, 239–48 (2002).
56. Simpson, A. G. B., Bernard, C. & Patterson, D. J. The ultrastructure of *Trimastix marina* Kent 1880 (Eukaryota), an excavate flagellate. *European Journal of Protistology* **36**, 229–251 (2000).
57. Stechmann, A., Baumgartner, M., Silberman, J. D., Roger, A. J. The glycolytic pathway of *Trimastix pyriformis* is an evolutionary mosaic. *BMC evolutionary biology* **6**, 101 (2006).
58. Stechmann, A. *et al.* Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current biology : CB* **18**, 580–5 (2008).
59. Takahashi, Y. & Tokumoto, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *The Journal of biological chemistry* **277**, 28380–3 (2002).

60. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680 (1994).
61. Touz, M. C. *et al.* Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *Journal of cell science* **121**, 2930–8 (2008).
62. Tovar, J., Fischer, A. & Clark, C. G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* **32**, 1013–1021 (1999).
63. Townson, S. M., Upcroft, J. A. & Upcroft, P. Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **79**, 183–193 (1996).
64. Tsaousis, A. D. *et al.* Evolution of Fe/S cluster biogenesis in the anaerobic parasite *Blastocystis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10426–31 (2012).
65. Wollers, S. *et al.* Iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly: the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. *The Journal of biological chemistry* **285**, 23331–41 (2010).
66. Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C. & Greenwood, C. A. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *The Biochemical journal* **236**, 729–39 (1986).
67. Yarlett, N., Coleman, G. S., Williams, A. G. & Lloyd, D. Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. *FEMS Microbiology Letters* **21**, 15–19 (1984).
68. Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Localization and targeting of an unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell* **9**, 926–33 (2010).
69. Žárský, V., Tachezy, J. & Doležal, P. Tom40 is likely common to all mitochondria. *Current biology : CB* **22**, R479–81; author reply R481–2 (2012).
70. Zubáčová, Z. *et al.* The Mitochondrion-Like Organelle of *Trimastix pyriformis* Contains the Complete Glycine Cleavage System. *PLoS ONE* **8**, e55417 (2013).

## **PŘÍLOHA**

# The Mitochondrion-Like Organelle of *Trimastix pyriformis* Contains the Complete Glycine Cleavage System

Zuzana Zubáčová<sup>1</sup>, Lukáš Novák<sup>1</sup>, Jitka Bublíková<sup>1</sup>, Vojtěch Vacek<sup>1</sup>, Jan Fousek<sup>2</sup>, Jakub Rídl<sup>2</sup>, Jan Tachezy<sup>1</sup>, Pavel Doležal<sup>1</sup>, Čestmír Vlček<sup>2</sup>, Vladimír Hampel<sup>1\*</sup>

**1** Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Parasitology, Prague, Czech Republic, **2** Institute of Molecular Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

## Abstract

All eukaryotic organisms contain mitochondria or organelles that evolved from the same endosymbiotic event like classical mitochondria. Organisms inhabiting low oxygen environments often contain mitochondrial derivatives known as hydrogenosomes, mitosomes or neutrally as mitochondrion-like organelles. The detailed investigation has shown unexpected evolutionary plasticity in the biochemistry and protein composition of these organelles in various protists. We investigated the mitochondrion-like organelle in *Trimastix pyriformis*, a free-living member of one of the three lineages of anaerobic group Metamonada. Using 454 sequencing we have obtained 7 037 contigs from its transcriptome and on the basis of sequence homology and presence of N-terminal extensions we have selected contigs coding for proteins that putatively function in the organelle. Together with the results of a previous transcriptome survey, the list now consists of 23 proteins – mostly enzymes involved in amino acid metabolism, transporters and maturases of proteins and transporters of metabolites. We have no evidence of the production of ATP in the mitochondrion-like organelle of *Trimastix* but we have obtained experimental evidence for the presence of enzymes of the glycine cleavage system (GCS), which is part of amino acid metabolism. Using homologous antibody we have shown that H-protein of GCS localizes into vesicles in the cell of *Trimastix*. When overexpressed in yeast, H- and P-protein of GCS and cpn60 were transported into mitochondrion. In case of H-protein we have demonstrated that the first 16 amino acids are necessary for this transport. Glycine cleavage system is at the moment the only experimentally localized pathway in the mitochondrial derivative of *Trimastix pyriformis*.

**Citation:** Zubáčová Z, Novák L, Bublíková J, Vacek V, Fousek J, et al. (2013) The Mitochondrion-Like Organelle of *Trimastix pyriformis* Contains the Complete Glycine Cleavage System. PLoS ONE 8(3): e55417. doi:10.1371/journal.pone.0055417

**Editor:** Valdur Saks, Université Joseph Fourier, France

**Received:** September 10, 2012; **Accepted:** December 22, 2012; **Published:** March 13, 2013

**Copyright:** © 2013 Zubáčová et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Grant Agency of the Charles University 97309 (to JB) and by Czech Science Foundation P506/12/1010 (to VH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: vlada@natur.cuni.cz

## Introduction

In the last decades, systematic research has considerably improved our knowledge regarding the functions of mitochondrial homologues in many eukaryotic lineages. Particular interest has been paid to microbial parasites and protists that thrive facultatively or obligatorily under anaerobic or microaerophilic conditions (for recent reviews see e.g. [1–3]). It has been shown that their mitochondria often deviate remarkably from the textbook picture. For example, various reductions of components of membrane electron transport chain can be found. Instead of canonical four complexes plus  $F_0F_1$  ATPase, the complexes III and IV are absent in *Blastocystis* and *Nyctotherus* derivatives of mitochondrion [4–7]. The path of electrons in these truncated electron transport chains ends at fumarate or in the case of *Blastocystis* also at oxygen to which the transfer is mediated by the complex of alternative oxidase [4–7]. Many obligatory anaerobes and microaerophiles lack a respiratory chain completely [3,8,9] and the enzyme [FeFe]hydrogenase provides the sink for electrons produced by redox reactions in their organelles. This enzyme transfers these electrons to protons producing hydrogen gas, a

typical feature of hydrogenosomes that represent one functional class of organelles homologous to mitochondrion. Notable variation has evolved also in the enzymatic machinery metabolizing pyruvate. In mitochondria of anaerobes and microaerophiles, the canonical pyruvate dehydrogenase complex is usually substituted by the analogous enzymes pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, pyruvate:NADH oxidoreductase or pyruvate formate lyase [10–12]. Some organisms possess two or even all three types of these enzymes. Finally, neither the metabolism of pyruvate nor the ATP production is a function common to all mitochondrial homologues. These processes are absent in the most minimalistic versions of these organelles – mitosomes of *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium* and microsporidia [8,13–17]. Yet, the mitochondria even in their miniature form are apparently still essential for eukaryotic cells, as all eukaryotes studied so far possess them. The functions of these minimalistic mitochondrial homologues (mitosomes) and perhaps the most basic function of all mitochondrial homologues, has not been established yet. The synthesis of FeS clusters is often mentioned in this context [18].

Metamonada is a group composed exclusively of anaerobes and microaerophiles [19,20]. The mitochondrial organelles of two

metamonad lineages, parabasalids (i.e. *Trichomonas*) and fornicates (i.e. *Giardia*), have been extensively studied. It has been reported that the proteome of purified hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* consists of more than 500 proteins, however, many of them may be only externally associated [9,21]. The metabolism of the parabasalid hydrogenosome has been reconstructed to fine details and most enzymes have been biochemically characterized [22]. 139 proteins have been found in the mitosomal fraction of *Giardia*, however, only 20 of them have been experimentally verified as *bona fide* mitosomal proteins [8]. The only biochemically verified function of the *Giardia* mitosome remains the synthesis of FeS clusters [23]. The third lineage of Metamonada – Preaxostyla – consists of oxymonads and *Trimastix* [24]. Nothing is known about the mitochondrial homologues of oxymonads and besides one observation [25] no such organelles have been observed in this group. Double membrane bounded organelles have been described in *Trimastix* [26–28]. Several transcripts typical for mitochondrial proteins have been found among 10 000 transcriptome reads of *Trimastix pyriformis* (see Table 1 in [29]). Four of these transcripts (cpn60, H-protein, T-protein and P1-protein of glycine cleavage system) contained short extension at their 5' end in comparison with bacterial homologues, i.e. putative mitochondrial targeting sequences. However, none of these presequences are recognized by prediction software trained to recognize these sequences in other organisms. Likewise, none of these proteins have been experimentally localized to a cellular compartment. In this paper, we build on this previous work and present a more thorough transcriptome analysis based on 454 sequencing and more importantly bring the first experimental evidence for localization of cpn60 and enzymes of glycine cleavage system in the mitochondrial homologue of *Trimastix*.

## Results

### Proteins putatively localized to *Trimastix* mitochondrion-like organelle

In order to detect proteins putatively localized in the organelle of *Trimastix*, we have generated new set of transcriptomic data. In two runs of 454 sequencing of *Trimastix* mRNA we have produced in total 643 758 reads of *Trimastix* mRNA that were assembled into 7 037 contigs and 33 204 singletons. The contigs were automatically annotated using dCAS pipeline (<http://exon.niaid.nih.gov>). The contigs and singletons were then screened using HMM for proteins of protein transport machinery and mitochondrial carriers. Selected candidates were manually investigated for the presence of functional domains. Furthermore, the set of contigs and singletons was searched using standalone BLAST with *Giardia intestinalis* mitosomal proteins, *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins and TCA cycle enzymes as queries. Best hits were further screened by predictor of protein localization Euk-mPloc 2.0. [30]. Putative organellar proteins predicted by Euk-mPloc, in which the presence of N-terminal targeting presequence is expected, were investigated for the presence of N-terminal targeting signal by three predictor programs (Table S1). Besides two exceptions (HydE and ornithine transcarbamylase), the proteins were not strongly predicted as mitochondrially targeted. Nevertheless, 9 proteins (including HydE and ornithine transcarbamylase) showed N-terminal extensions relative to the bacterial homologues in their alignments (Figure S1). Even if most of these extensions were not recognized as putative targeting peptides, we still consider this possibility and below present experimental evidence that the extension present in the H-protein of glycine cleavage system is indeed required for protein targeting into mitochondrion. We used the presence of an N-terminal extension as an important criterion

for inclusion in the list of proteins predicted to localize into the mitochondrion-like organelle. Proteins in which the extension was not demonstrated were included only if they were functionally linked to other proteins in the list (hydG, P2-protein of glycine cleavage system) or if they were considered as strictly or almost strictly mitochondrially localized proteins (e.g. Tom40, Sam50, hydG, mitochondrial processing peptidase). The final list of proteins predicted to localize into the mitochondrion-like organelle of *Trimastix* on the basis of current data and the basis of data of Hampl et al. [29] is given in Table 1.

These proteins are involved in amino acid metabolism (glycine cleavage system, serine hydroxymethyltransferase, ornithine transcarbamylase), co-factor metabolism (pyridine nucleotide transhydrogenase  $\beta+\alpha$ , lipoyltransferase), transport and maturation of proteins (Tom40, Sam50, one member of Tim17 family, Pam18, mitochondrial processing peptidase, cpn60 and [FeFe]hydrogenase maturases) and transport of other metabolites (proteins of membrane carrier family). Mitochondrial type aconitase is the only enzyme involved in energy metabolism that was included in the list. Enzymes of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) and [FeFe]hydrogenase were not listed because there are no strong indications that they are localized in the organelle. Neither [FeFe]hydrogenase nor PFO contained obvious N-terminal extensions. The substrate specificity of four identified membrane carriers (PFAM PF00153) was estimated according to the sequence similarity as well as to the presence of the residues known to be involved in the substrate binding [31]. Hence, the inner membrane of the mitochondrion-like organelle likely accommodates the ADP/ATP, 2-oxodicarboxylate and folate carriers. Although the fourth identified protein shares the signature motives of the protein family, the substrate specificity could not be estimated due to the high sequence divergence.

### Glycine cleavage system is localized to *Trimastix* mitochondrion-like organelle

Given the fact that the complete set of glycine cleavage system (GCS) enzymes has been found in the transcriptome of *Trimastix* and that three of these proteins (H-, P1- and T-protein) contained 5' extensions, it seem likely that the complete glycine cleavage system is localized in the organelle. To corroborate this hypothesis we have performed three experiments.

Firstly, we have used the *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expression system with the assumption that protein localized into the mitochondrion-like organelles in *Trimastix* will also be recognized as mitochondrial protein by the yeast mitochondrion. As a positive control we have over-expressed a GFP-tagged version of *Trimastix* cpn60, the classical mitochondrial marker, in yeast. The fluorescence microscopy showed that the GFP signal co-localized with the signal from MitoTracker that highlighted yeast mitochondria (Figure 1). This demonstrates that the protein transport machinery of the yeast mitochondrion is able to recognize *Trimastix* organellar proteins. Analogously to cpn60, we over-expressed GFP-tagged P1- and H-proteins. The fluorescence microscopy showed that the GFP signal co-localized with the signal from MitoTracker (Figure 1) indicating that both proteins were transported into the yeast mitochondria. As a negative control we have over-expressed a GFP tagged H-protein that was truncated at the N-terminus and started with the 17<sup>th</sup> amino acid. The truncated H-protein remained in the cytosol of yeast (Figure 1). Besides serving as a negative control, the latter experiment also confirmed our expectation that the N-terminal extension observed in H-protein bears a signal necessary for targeting of the protein into the mitochondrion-like organelle.

**Table 1.** List of the proteins putatively localized in the mitochondrion-like organelle of *Trimastix pyriformis*.

Product	Sequence accession numbers	N-terminal extension	Experimental evidence
<b>Aconitase</b> TCA cycle enzyme	EU086483	Yes	No
<b>hydE</b> Maturation of [FeFe] hydrogenase	JX657285	Yes	No
<b>hydF*</b> Maturation of [FeFe] hydrogenase	JX657286	Yes	No
<b>hydG</b> Maturation of [FeFe] hydrogenase	JX657287	?	No
<b>H-protein of glycine cleavage system</b> central protein in GCS	EU086492	Yes	Yes
<b>P1-protein of GCS</b> Glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1	EU086490	Yes	Yes
<b>P2-protein of GCS</b> Glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2	EU086491	?	No
<b>L-protein of GCS</b> Dihydrolipoyl dehydrogenase	EU086501	No	No
<b>T-protein of GCS</b> Aminomethyltransferase	EU086485	Yes	No
<b>Lipoyltransferase</b> Lipoylisation of enzymes	EU086495	?	No
<b>Serine hydroxymethyltransferase*</b> Amino acid metabolism	JX657288	Yes	No
<b>Ornithine transcarbamylase*</b> Amino acid metabolism	JX657289	Yes	No
<b>Tom40</b> Protein transport	EU086500	NA	No
<b>Sam50*</b> Protein transport	JX657290	NA	No
<b>Tim17 protein family member*</b> Protein transport	JX657291	No	No
<b>Pam18*</b> Protein transport	JX657292	No	No
<b>Mitochondrial processing protease <math>\alpha</math> subunit</b> Targeting sequence cleavage	EU086496	No	No
<b>Cpn60</b> Protein folding	EU086489	Yes	Yes
<b>Pyridine nucleotide transhydrogenase beta+alpha</b> NAD and NADP interconversion	EU086499	No	No
<b>Membrane carrier 1</b> Putative ATP/ADP transporter	EU086488	No	No
<b>Membrane carrier 2*</b> Putative 2-oxodicarboxylate carrier	JX657293	No	No
<b>Membrane carrier 3</b> Putative folate carrier	EU086487	?	No
<b>Membrane carrier 4*</b> Transporter with unknown specificity	JX657294	?	No

\*The transcripts were identified in this study  
doi:10.1371/journal.pone.0055417.t001

Secondly, we have used immunofluorescence microscopy (Figure 2A, Figure S2) with two antibodies against the H-protein of GCS – a commercial antibody against human H-protein (green signal) and our in-house prepared antibody against *Trimastix* H-protein (red signal). The green signal showed several spots that co-localized with the red signal revealing dozens of bodies (putative mitochondrion-like organelles) distributed predominantly around the nucleus and in the posterior-ventral part of the cell.

Finally, we have applied the antibody against *Trimastix* H-protein on the Western blot of cell fractions of *Trimastix* (Figure 2B). The signal of the expected size appeared in the high speed pellet (HSP) and in the total lysate of *Trimastix* but neither in the lysate of bacteria from the *Trimastix* culture (Bact) nor in the supernatant (Sup) that contains the cytoplasm of *Trimastix*.

To see whether the organelle of *Trimastix* produces observable proton potential, we have stained the cell of *Trimastix* with MitoTracker Red CMXRos dye that specifically accumulates in the mitochondria upon the presence of the membrane potential. No stained vesicles were observed in *Trimastix* cells and only diffused cytosolic signal was detected. Similar results were obtained when MitoTracker Green FM was used, which does not require membrane potential (not shown).

## Discussion

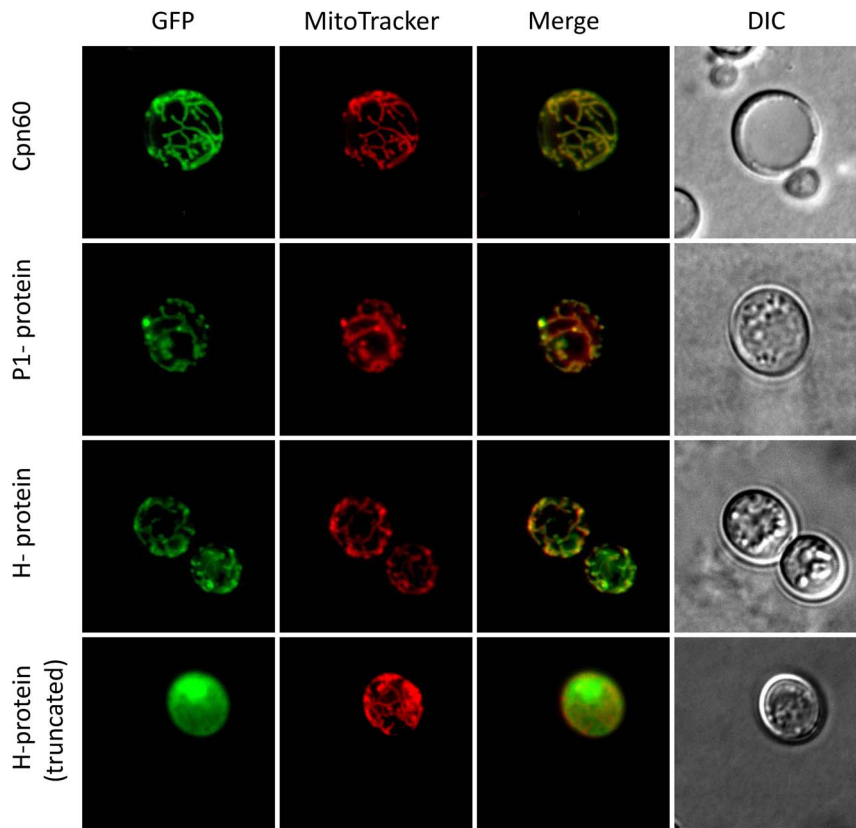
In this second transcriptomic study of *Trimastix pyriformis* we have produced, using 454 technology, more than 60x more reads which formed 2,6x more contigs (not counting singletons) than in the previous study [29]. Despite the massive increase in the amount of data, we were able to predict only 8 new proteins that putatively localize to the mitochondrion-like organelle (marked by stars in the Table 1). These include HydF, serine hydroxymethyltransferase, ornithine transcarbamylase, Sam50, Tim17 protein family member and Pam18. The number of contigs assembled (7 037 in this data set) is unlikely to cover the complete transcriptome and so the discovery of new organellar proteins is expected in the future.

In addition to the *in silico* study, we gathered the first experimental evidence in support of organellar localization of cpn60 and two of the four enzymes of glycine cleavage system (H- and P1-protein). The evidence for putative functions of the mitochondrion-like organelle is discussed below.

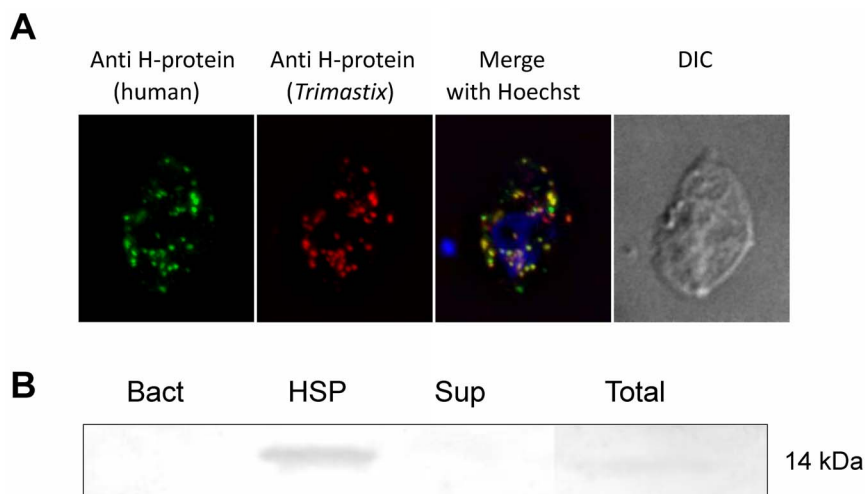
### Amino acid metabolism

As many as seven enzymes in the list are directly involved in amino acid metabolism, namely H-, P1-, P2-, T- and L-protein of GCS, serine hydroxymethyltransferase (SHMT) and ornithine





**Figure 1. Over-expression of *Trimastix* proteins in yeast.** The over-expression of GFP tagged proteins of *Trimastix* in *Saccharomyces cerevisiae*. The columns represent the signals from GFP tag (green), MitoTracker (red), merged GFP and MitoTracker and DIC. Rows represent individual proteins: cpn60, P1-protein of GCS, H-protein of GCS and H-protein of GCS truncated of the first 16 amino acids.  
doi:10.1371/journal.pone.0055417.g001



**Figure 2. H-protein of GCS localizes into vesicles (putative mitochondrion-like organelles) in *Trimastix pyriformis*.** A) Immunofluorescence microscopy of the *Trimastix pyriformis* cell. The green signal from antiH-protein (human) co-localizes with red signal from the antiH-protein (*Trimastix*). The DNA is stained blue with Hoechst. B) Western blot on the cellular fractions of *Trimastix pyriformis*. The lines represent pure bacteria *Citrobacter* sp. from the culture (Bact), high speed pellet of *Trimastix* (HSP), supernatant of *Trimastix* (Sup), total lysate of *Trimastix* (Total).  
doi:10.1371/journal.pone.0055417.g002

transcarbamylase (OTC), the eighth enzyme, lipoyltransferase, is involved only indirectly by lipoylation of the H-protein [32].

The GCS catalyses a cycle of glycine catabolising reactions producing methyl-tetrahydrofolate, NADH and CO<sub>2</sub> and it can function also in the opposite direction [33]. In eukaryotes, the cycle is typically localized in the mitochondrion. The evidence for the localization of GCS in the mitochondrion-like organelle of *Trimastix pyriformis* seems to be relatively strong. All five enzymes are present in the transcriptome (the two subunits of P-protein are coded as separate proteins). Three of them (H, P1 and T) carry an N-terminal extension and in the case of H-protein we have shown that the N-terminal extension is necessary for its targeting to the yeast mitochondrion. Two of these proteins (H and P1) have been transported into the mitochondrion when over-expressed in yeast, and finally the H-protein has been shown to be present in vesicles (putative mitochondrion-like organelles) in *Trimastix*, by co-localization of two antibodies. Although the ultimate evidence of immunoelectron microscopy of *Trimastix* with anti H-protein antibodies is still missing, considering the fact that GCS has never been observed outside mitochondria or relative organelles in other eukaryotes, the presence of the pathway in the mitochondrion-like organelle of *Trimastix* is very likely.

Serine hydroxymethyltransferase catalyses a reversible conversion of L-serine and tetrahydrofolate to glycine and 5,10-methylenetetrahydrofolate. The reaction may therefore be directly connected to GCS. Various isoforms of SHMT are present in the cytosol, mitochondria and plastids of eukaryotes [34]. The *Trimastix* enzyme contains an N-terminal extension when compared to the bacterial counterparts and so we regard it as putatively localized into the mitochondrion-like organelle (Figure S1).

Ornithine transcarbamylase catalyses the reaction between ornithine and carbamoyl phosphate with the formation of citrulline. This reaction is a part of arginine catabolism in some protists (arginine dihydrolase pathway) and of the urea cycle in mammals. The arginine dihydrolase pathway consists of three enzymes: arginine deiminase (ADI), OTC and carbamoyl kinase (CK). It is localized in the hydrogenosome of *Neocallimastix frontalis* [35] but in the cytosol of *Giardia* [36], where it represents an important source of ATP. In *Trichomonas vaginalis*, the pathway is believed to be present also in the cytosol, however one enzyme of the pathway, ADI, was found in the hydrogenosome [37]. While ADI was not found in the transcriptome, CK is likely present in *Trimastix pyriformis*. Similar to OTC, the *Trimastix* CK is related to prokaryotic CKs but unlike OTC it apparently does not carry an N-terminal extension and therefore was not included in the Table 1. The prokaryotic nature of both enzymes suggests that they may represent bacterial contamination of the transcriptome data set. On the other hand, the relatively high number of reads for these transcripts (1486 for OTC and 640 for CK), which is more than the number of reads of H-protein of GCS (233 reads) or SHMT (210 reads) indicate that they may represent *bona fide* *Trimastix* enzymes. The prokaryotic origin of *Trimastix* enzymes is, in fact, quite common and other examples of such enzymes are the P1-protein of GCS [29], for which organellar localization was confirmed experimentally in this paper, and 4 out of 10 glycolytic enzymes [38]. The confirmation of the presence and cellular localization of arginine dihydrolase pathway in *Trimastix pyriformis* deserves future research.

### Energy metabolism

The only protein in the list directly involved in the energy metabolism is a tricarboxylic-acid-cycle-enzyme aconitase. The localization of a sole enzyme from the cycle in the compartment is,

however, very suspicious, and this localization must be verified experimentally before it should be considered more seriously. Even if its localization was confirmed the actual function of the solitary enzyme would remain questionable. Nevertheless this protein fulfills the conditions to be included in the list. Being a homologue of mitochondrial type aconitase and not the cytosolic version it was predicted to localize in the mitochondrion-like organelle by Euk-mPloc 2.0. and, furthermore, it contains a short N-terminal extension.

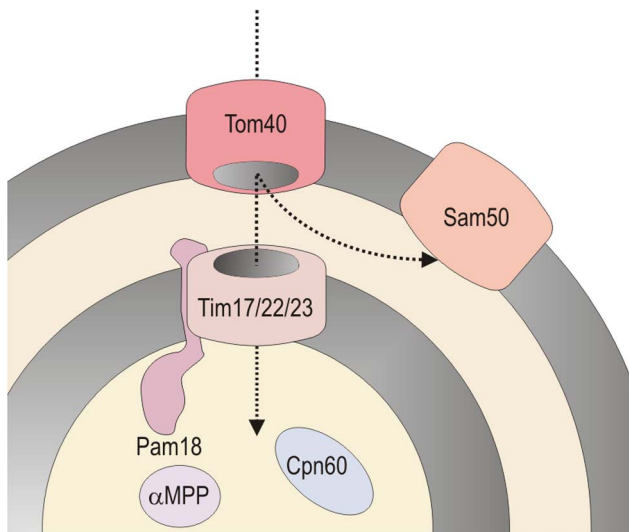
The set of all three maturases of [FeFe]hydrogenase was found in the transcriptome. Contigs for two of them have complete N-terminus with an extension. These enzymes are essential for maturation of [FeFe]hydrogenase in bacteria [39] but they have been reported from only 5 eukaryotes so far: *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mastigamoeba balamuthi*, *Acanthamoeba castellanii* and *Andalucia incarcerate* [10,40,41]. In *Trichomonas* and *Chlamydomonas* these proteins are localized in the hydrogenosomes and plastids respectively [40,41]. It is generally believed that the maturases are always localized in the organelle where they assist the maturation of the H-cluster of [FeFe]hydrogenase. The presence of the N-terminal extensions makes them serious candidates for organellar proteins in *Trimastix*. The presence of maturases would suggest that the [FeFe]hydrogenase itself is present in the organelle as well. So far we have no evidence for the localization of [FeFe]hydrogenase and none of the three homologues present among the transcripts bears N-terminal extension indicating the organellar localization. For this reason, [FeFe]hydrogenase was not included in the Table 1. The same applies to pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, an enzyme that is often functionally connected to [FeFe]hydrogenase.

### Protein transport

Six proteins involved in the transport, processing and maturation of proteins (not counting the specific [FeFe]hydrogenase maturases) have been found: Tom40, Sam50, one member of Tim17/22/23 family, Pam18,  $\alpha$  subunit of mitochondrial processing peptidase ( $\alpha$ MPP) and cpn60 (Figure 3). This set of proteins represents the basic functional core of protein transport machinery: Tom40 and Tim17/22/23 being the outer- and inner-membrane transport pores, respectively, Sam50 functions as assembly machinery for Tom40 and Pam18 being the part of the motor complex associated with Tim17/22/23 translocase. Upon protein import the MPP cleaves off the targeting peptides and cpn60 assists the protein folding. The *Trimastix* protein transport machinery in this composition would be slightly more complex than the machinery in the mitosome of *Giardia* where the inner membrane pore and Sam50 is missing [8]. We however expect that the *Trimastix* protein transport machinery set is not complete yet and more components will be discovered in the future. Conspicuously absent from all *Trimastix* genomic data sets are the genes encoding  $\beta$ MPP and mtHsp70, two proteins that have been found in most mitochondrion-related organelles examined to date.

### Other membrane proteins

Pyridine nucleotide transhydrogenase (PNT) used to be regarded as a specific protein of the inner membrane of the mitochondrion [42] until Yousuf et al. [43] have shown that it localizes into vesicles different from mitosomes in *Entamoeba histolytica*. PNT transfers hydride ion between NAD(H) and NADP(H) and simultaneously transfers proton across the membrane [44]. Structurally the protein functions as a homodimer and each monomer consist of two domains  $\alpha$  and  $\beta$ . These domains are expressed as separate proteins in prokaryotes but as a single



**Figure 3. Schematic representation of protein import machinery in *Trimastix pyriformis* mitochondrion-like organelle.**  
doi:10.1371/journal.pone.0055417.g003

protein in eukaryotes. In the first study of the transcriptome of *Trimastix* [29], we found the domains in separate contigs and concluded that they were expressed independently as in prokaryotes. In the assembly of the 454 reads, however, the two subunits appeared in a single contig suggesting that the two domains are encoded by a single gene and expressed as a single protein like in other eukaryotes.

In the present and previous study we have identified altogether four members of the mitochondrial carrier family and we designated them as membrane carrier protein 1–4. As proteins from this family have also been reported from the membranes of peroxisomes and plastids [45–47], their presence in the membrane of mitochondrion-like organelle is only putative. The carriers designated now as carriers 1 and 3 have been previously reported upon [29], the carriers 2 and 4 were identified in the current data set. The carrier 3 listed in the Table 1 in [29] has been excluded from the current list, as we have serious doubts about its affiliation into mitochondrial carrier family. According to the conserved residues and phylogenetic relationships to other carriers we expect that carrier 1 transports adenine nucleotides (e.g. ATP, NAD), carrier 2 transports 2-oxodicarboxylates (e.g. 2-oxoglutarate) and carrier 3 transports folate. The substrate specificity of carrier 4 cannot be predicted from the sequence itself. The presence of glycine cleavage complex in the organelle indeed requires the transport of NAD/NADH and folate but also the transport of amino acids (glycine or serine). The latter molecules may be transported by carrier 4 or by carriers that have not been identified so far. Mitochondrial carriers typically need a proton potential across the inner mitochondrial membrane to properly function [31]. As we were not able to detect a proton potential using MitoTracker Red, it is possible that the carriers can operate under small or even without membrane potential. Similarly the carrier proteins of peroxisomes [31] and *Entamoeba* mitochondria [48] are thought to be membrane potential-independent.

## Conclusions

The transcriptome sequencing using 454 technology enriched the list of proteins putatively localized into the mitochondrion-like organelle of *Trimastix* to a total number of 23 proteins. Most of

these proteins are involved in the metabolism of amino acids, transport and maturation of proteins and transport of metabolites. Neither PFO nor [FeFe]hydrogenase were included in the list as there is no evidence for them to be present in the organelle neither there is evidence that the organelle produces ATP. Mitochondrial localization of most of the listed proteins remains only putative and should be confirmed experimentally in the future. The first such evidence has been presented for the enzymes of glycine cleavage complex, which is at the moment the only experimentally localized pathway in the *Trimastix* mitochondrion-like organelle.

## Materials and Methods

### Preparation of *T. pyriformis* cDNA

*T. pyriformis* (strain RCP-MX, ATCC 50935) total RNA was isolated from  $16 \times 10^7$  cells using TRIzol Reagent (Invitrogen). *T. pyriformis* mRNA transcriptome was captured from total RNA with Dynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen). cDNA was then prepared using Smarter PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) according to the manufacturer's protocol with 19 cycles of cDNA amplification.

### 454 transcriptome sequencing and annotation

Sequencing library optimized for Roche/454 Titanium sequencing was prepared using GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit from double-stranded cDNA. Fragment library was titrated by enrichment and prepared for sequencing by emulsion PCR on two regions of a two-region GS-FLX Titanium PicoTitre™ plate. The reads were cleaned of all adaptor/primer and polyA sequence. Newbler (v2.6; Roche/454 Sequencing) and the default parameters (40 bp overlap; 90% identity) were used for the assembly of 644 537 reads (average length 399 bp). These were assembled into 7 037 contigs and 6 255 isogroups (33 204 singletons remained). Isogroups can either represent alternatively spliced genes (with contigs indicating exons, and isotigs representing splice forms), or sets of recently duplicated genes (with contigs representing regions of divergence since duplication, and isotigs representing the divergent genes) either as gene families or multiple alleles of the same gene.

All contigs were automatically annotated using dCAS pipeline (<http://exon.niaid.nih.gov>). In this pipeline all the contigs were analyzed by SignalP 3.0 server [49] to predict import signals and with TMHMM2.0 server [50] to predict transmembrane  $\alpha$ -helices. Local BLASTX search against downloaded NCBI database (non redundant protein database from 11.7.2012) was used for annotation of contigs.

Candidate proteins of membrane protein translocation complexes were determined by HMM search of all six frame translation of contigs and singletons. The selected transcripts were further analyzed by HHpred search at <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred> [51].

Standalone BLAST searches against the *Trimastix* contigs and singletons were performed in BioEdit 7.1.3.0. [52] using the set of 20 mitochondrial proteins of *Giardia intestinalis* [8] and 413 hydrogensomal proteins of *Trichomonas vaginalis* (Table S1 in [9]) as queries. The best hits were further submitted to Euk-mPloc 2.0 [30] for prediction of cellular localization. Proteins that were predicted to localize into mitochondria or chloroplasts were further investigated. For each such candidate for mitochondrial matrix protein, 10–20 closest eukaryotic and prokaryotic homologues were downloaded from the GenBank. The proteins were aligned and the alignment was manually refined in BioEdit 7.1.3.0. [52]. The completeness of the *Trimastix* protein sequences, the start codons and the presence or absence of N-terminal

extension were estimated based on this alignment. *Trimastix* proteins that exhibited N-terminal extension relatively to the prokaryotic homologues were selected.

The sequences of newly determined candidate organellar proteins are stored in GenBank under accession numbers JX657285-JX657294. The Transcriptome Shotgun Assembly project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GAFH00000000. The version described in this paper is the first version, GAFH01000000.

#### Preparation of constructs for over-expression in yeast

*T. pyriformis* genes were PCR amplified from cDNA using EmeraldAmp Max PCR Mastermix (Takara) and the following primers: Glycine cleavage system H-protein (GenBank ID: EU086492) – 5′**TCTAGA**ATGCAGCGCCTTTTCTCT (XbaI site in bold) and 5′**AAGCTT**ATGCTGGGTCTTGAGGAA (HindIII site in bold); N-terminally truncated version of H-protein – 5′**TCTAGA**ATGGCTCGGTTTGCCGCGCAG (XbaI site in bold) and 5′**AAGCTT**ATGCTGGGTCTTGAGGAA (HindIII site in bold); P1 protein of glycine cleavage system (GenBank ID: EU086490) – 5′**TCTAGA**ATGCAGAACCTTTCTCGC (XbaI site in bold) and 5′**AGCTT**CAGGGAGGCGCGCAGGGC (HindIII site in bold); cpn60 (GenBank ID: EU086489) – 5′**TCTAGA**ATGCAGGCCCTGTTTCC (XbaI site in bold) and 5′**AAGCTT**GAATGGCTTGGGCAGGCC (HindIII site in bold). The PCR products were cloned into pUG35 vector with GFP tag at the 3′ end.

#### Transformation of yeasts

The wild type *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH499 (ATCC number: 204679) was used in this study. Yeasts were grown on plates with YPD agar medium (for 500 ml: D-glucose, Penta: 10 g; yeast extract, Oxoid: 5 g; trypticase peptone, BBL: 10 g; agar, Oxoid: 6 g) at 30°C. Transformation of the yeasts with 2 µg of plasmid DNA was performed using LiAc/SS-DNA/PEG method according to Gietz and Schiestl [53]. Transformants were selected on synthetic drop-out medium without uracil (for 500 ml: D-glucose, Penta: 10 g; yeast nitrogen base, Sigma: 3,35 g; yeast synthetic drop-out medium supplement, Sigma: 0,96 g; agar, Oxoid: 6 g) at 30°C. Only transformants containing plasmids with cloned *T. pyriformis* genes were able to grow on medium lacking uracil. Expression of GFP-tagged proteins of *T. pyriformis* in yeasts was analyzed 3 days after transformation. Mitochondria were labeled with MitoTracker Red CMXRos dye (Molecular probes, cat. # M7512).

#### Antibody production

Rat polyclonal antibody was raised against *T. pyriformis* GCS H-protein. A 6xHis-tagged version of this protein was expressed from plasmid pET42b in *Escherichia coli* BL21 DE3. Protein was purified by immobilized-metal affinity chromatography using Ni-NTA resin under denaturing conditions using 8 M urea according to the protocol described in the QIAExpressionist handbook (Qjagen). A rat was immunized with purified protein in acrylamide gel for a period of 12 weeks (300 µg of antigen was used per 1 subcutaneous injection every 4 weeks).

The serum specific for *T. pyriformis* GCS H-protein was tested for reactivity on Western blot using *Trimastix* cell fractions (whole cell lysate, cytoplasm, high speed pellet) as well as *Citrobacter* sp. lysate.

#### *Trimastix* fractionation of cellular extracts

*T. pyriformis* cell fractions (cytosol and organelle-rich fraction) were obtained by differential centrifugation as previously described [54] with slight modifications. *T. pyriformis* (2.5 liters of the cell culture) was filtered from bacteria using Cyclopore Track Etched Membrane, 3µm (Whatman). Filtered *Trimastix* was pelleted by centrifugation for 10 minutes at 3000 x g. Cells were resuspended in 1 ml of cold 3% LB medium (L3022, Sigma; for 3% LB dilute 30 ml of LB medium in 970 ml of distilled water) containing protease inhibitor cocktail (Roche, cat. # 11836170001). Cells were placed on ice and homogenized by sonication (1–2 times for 1 minute at amplitude 40). Cells were checked by light microscope after each round of sonication. Homogenate was centrifuged for 10 minutes at 500 x g at 4°C. The pellet was discarded. The supernatant was centrifuged 30 minutes at 100000 x g at 4°C to pellet the organelles. Organelles were resuspended to final volume of 50µl of 3% LB medium containing protease inhibitor cocktail. The supernatant containing the cytosol was centrifuged again for 45 minutes at 100000 x g at 4°C. The pellet was discarded.

*T. pyriformis* cell fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

#### Preparation on *Trimastix pyriformis* immunofluorescence slides

The slides were prepared using immunostaining protocol with coverslips according to Dawson et al. [55] with the following modifications. *Trimastix* cells in the growth medium were fixed with 2% paraformaldehyde solution for 30 minutes at room temperature. Fixed cells were dispensed on coverslips coated with 15 µl of Poly-L-lysine solution (Sigma) and left for one hour to adhere. Coverslips with adhered cells were air dried. Preparations were blocked with PEMBALG solution (PEM buffer; 1% BSA; 0,5% cold water fish skin gelatin; 100 mM lysine; 0,1% sodium azide) for 30 minutes at room temperature. Cells were incubated overnight with antibodies against human GCS H (Abnova) and against *Trimastix* GCS H (both diluted 1:200) on parafilm. Preparations were incubated on parafilm with secondary antibodies AlexaFluor 488 Goat Anti-Mouse and AlexaFluor 594 Goat Anti-Rabbit (Molecular probes) diluted 1:1000. Coverslips were washed three times with PEM buffer. The last wash was performed with addition of the Hoechst 33342 stain (Molecular probes) into PEM buffer (1:1000 of dilution). Coverslips were mounted onto slides using VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories).

#### Immunofluorescence microscopy

The images were collected using a fluorescence microscope IX81 equipped with IX2-UCB camera (Olympus) with a 100x immersion oil objective and CellR software. Images were processed by ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

#### Supporting Information

**Figure S1 The N-terminal parts of protein alignments demonstrating the presence of extension in *Trimastix* protein relatively to the prokaryotic homologues.** (PDF)

**Figure S2 Immunofluorescence microscopy of two additional *Trimastix pyriformis* cells.** The green signal from antiH-protein (human) co-localizes with red signal from the antiH-protein (*Trimastix*). The DNA is stained blue with Hoechst. (PDF)

**Table S1 The probability of mitochondrial localization of selected *Trimastix* proteins as predicted by PSORT II, TargetP and Multiloc2 programs. (DOCX)**

## Acknowledgments

Authors would like to thank Veronika Harsová for technical assistance and Joel B. Dacks for proofreading and helpful comments.

## References

- Hjort K, Goldberg AV, Tsaousis AD, Hirt RP, Embley TM (2010) Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:713–27.
- Shiflett AM, Johnson PJ (2010) Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu Rev Microbiol* 64:409–29.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, et al. (2012) Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:444–95.
- Boxma B, de Graaf RM, van der Staay GW, van Alen TA, Ricard G, et al. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434:74–9.
- Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocail V, Gaston D, Richmond GS, et al. (2008) Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* 18:580–5.
- Pérez-Brocail V, Clark CG (2008) Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol* 25:2475–82.
- Denocud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, et al. (2011) Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 12:R29.
- Jedelský PL, Doležal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, et al. (2011) The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* 6:e17285.
- Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, Dyal SD, Hayes RD, et al. (2011) The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int J Parasitol* 41:1421–34.
- Hug LA, Stechmann A, Roger AJ (2010) Phylogenetic distributions and histories of proteins involved in anaerobic pyruvate metabolism in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 27:311–324.
- Stairs CW, Roger AJ, Hampl V (2011) Eukaryotic pyruvate formate lyase and its activating enzyme were acquired laterally from a Firmicute. *Mol Biol Evol* 28:2087–99.
- Hampl V, Stairs CW, Roger AJ (2011) The tangled past of eukaryotic enzymes involved in anaerobic metabolism. *Mob Genet Elements* 1:71–74.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, et al. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450–453.
- Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, et al. (2008) Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452: 624–628.
- Mogi T, Kita K (2012) Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitol Int* 59:305–12.
- Doležal P, Dagley MJ, Kono M, Wolyneć P, Likić VA, et al. (2010) The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogen* 6:e1000812.
- Mi-ichi F, Makiuchi T, Furukawa A, Sato D, Nozaki T (2011) Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1263.
- Lill R, Kispal G (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000 25:352–6.
- Cavalier-Smith T (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalida, *Carpodimonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1741–58.
- Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, et al. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3859–64.
- Rada P, Doležal P, Jedelský PL, Bursac D, Perry AJ, et al. (2011) The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 6:e24428.
- Hrdy I, Tachezy J, Müller M (2008) Metabolism of trichomonad hydrogenosomes. In: Tachezy J, editor. *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 114–145.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, et al. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426:172–6.
- Simpson AG (2003) Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematic in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1759–77.
- Carpenter KJ, Waller RF, Keeling PJ (2008) Surface morphology of *Saccharobaculus* (Oxymonadida): implications for character evolution and function in oxymonads. *Protist* 159:209–21.
- Brugerolle G, Patterson D (1997) Ultrastructure of *Trimastix convexa* Hollande, an amitochondrial anaerobic flagellate with a previously undescribed organization. *Europ J Protistol* 33: 121–130.
- O'Kelly CJ, Farmer MA, Nerad TA (1999) Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al.: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist* 150: 149–162.
- Simpson AGB, Bernard C, Patterson DJ (2000) The ultrastructure of *Trimastix marina* Kent, 1880 (eukaryota), an excavate flagellate. *Europ J Protistol* 36: 229–251.
- Hampl V, Silberman JD, Stechmann A, Diaz-Triviño S, Johnson PJ, et al. (2008) Genetic evidence for a mitochondrial ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS One* 3:e1383.
- Chou KC, Shen HB (2010) A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: EukmPLoc 2.0. *PLoS One* 5:e9931.
- Kunji ER, Robinson AJ (2006) The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* 1757:1237–48.
- Fujiwara K, Okamura-Ikeda K, Packer L, Motokawa Y (1997) Synthesis and Characterization of Selenolipoylated H-protein of the Glycine Cleavage System *J Biol Chem* 272: 19880–19883.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* 6: 167–176.
- Besson V, Naulburger M, Rebeille F, Douce R (1995) Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterization of the mitochondrial and chloroplastic isoforms". *Plant Physiol Biochem* 33: 665–673.
- Gelius-Dietrich G, Ter Braak M, Henze K (2007) Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *J Eukaryot Microbiol* 54:42–4.
- Touz MC, Rópolo AS, Rivero MR, Vraných CV, Conrad JT (2008) Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci* 121:2930–8.
- Morada M, Smíd O, Hampl V, Sutak R, Lam B, et al. (2011) Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 176:51–4.
- Stechmann A, Baumgartner M, Silberman JD, Roger AJ (2006) The glycolytic pathway of *Trimastix pyriformis* is an evolutionary mosaic. *BMC Evol Biol* 6:101.
- Meyer J (2007) [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* 64: 1063–1084.
- Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Zhang L, Seibert M, et al. (2004) Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* 279: 25711–25720.
- Putz S, Doležal P, Gelius-Dietrich G, Boháčová L, Tachezy J, et al. (2006) Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 5: 579–586.
- Clark CG, Roger AJ (1995) Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6518–21.
- Yousuf MA, Mi-ichi F, Nakada-Tsukui K, Nozaki T (2010) Localization and targeting of an unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* 9:926–33.
- Olausson T, Fjellstrom O, Meuller J, Rydstrom J (1995) Molecular biology of nicotinamide nucleotide transhydrogenase—a unique proton pump. *Biochim Biophys Acta* 1231: 1–19.
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, et al. (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* 20: 5049–5059.
- Bedhomme M, Hoffmann M, McCarthy EA, Gambonnet B, Moran RG, et al. (2005) Folate metabolism in plants: an *Arabidopsis* homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *J Biol Chem* 280: 34823–34831.
- Satre M, Mattei S, Aubry L, Gaudet P, Pelosi L, et al. (2007) Mitochondrial carrier family: Répertoire and peculiarities of the cellular slime mould *Dicystelium discoideum*. *Biochimie* 89: 1058–1069.
- Doležal P, Dagley MJ, Kono M, Wolyneć P, Likić VA, et al. (2010) The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogen* 6:e1000812.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VH JT ZZ PD CV. Performed the experiments: ZZ LN VV JR JB JF. Analyzed the data: VH PD CV. Contributed reagents/materials/analysis tools: VH CV. Wrote the paper: VH.

49. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2: 953–971.
50. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567–80.
51. Söding J, Biegert A, Lupas AN (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue):W244–8.
52. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
53. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355–60.
54. Drmota T, Proost P, Van Ranst M, Weyda F, Kulda J, et al. (1996) Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol* 83:221–34.
55. Dawson SC, Pham JK, House SA, Slawson EE, Cronembold D, et al. (2008) Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spironucleus vortens*. *BMC Microbiol* 8:71.