

PRAKTIKUM Z MOLEKULÁRNÍ PARAZITOLOGIE

(Jitka Hostomská, Lenka Horváthová, Pavel Doležal)

19.5.-31.5. 2013 – od 16:00 do ?

Dvoutýdenní experimentální praktikum z molekulární parazitologie je organizováno do tří projektů (viz níže), jejichž cílem je objevit funkce zkoumaných proteinů či celých organel v několika studovaných organismech. Cílem praktika je osvojení experimentální práce vycházející od studia problematiky, přes navržení postupů až po analýzu výsledků. Vždy se jedná o aktuální problematiku, která nebyla dosud řešena a nabízí se proto možnost objevu zcela nových poznatků. Účastníci budou rozděleni do tří pracovních skupin po třech. Praktikum bude probíhat v odpoledních a večerních hodinách na katedře parazitologie a přilehlých prostorách. Kromě práce se zajímavými organismy se účastníci praktika seznámí s metodami jako: RNA interference, northern blot, afinitní purifikace proteinů, *in vitro* transkripcie a *in vitro* protein import.

PROJEKT 1: Analýza funkce mitochondriálního přenašeče pyruvátu u *Trypanosoma brucei*.

V letošním roce byly u několika skupin eukaryot popsány proteiny MPC (mitochondrial pyruvate carrier), které, jak plyne z názvu, jsou zodpovědné za transport pyruvátu přes vnitřní membránu mitochondrie. Pyruvát v mitochondrii představuje především hlavní substrát pro tvorbu acetyl koenzymu A, jednoho z nejvýznamnějších vstupních substrátů reakcí citrátového cyklu a několika klíčových biosyntetických reakcí.

V genomu *T. brucei* jsme našli dva homology MPC a předpokládáme, že se podobně jako u kvasinek nebo savců podílejí na přenosu pyruvátu do mitochondrie. Jelikož energetický metabolismus *T. brucei* a některé z dotčených biosyntetických drah se od „modelové“ eukaryotní buňky zásadním způsobem liší, zajímá nás, jaký fenotyp budeme pozorovat po umlčení exprese MPC2. Právě knock down tohoto genu metodou RNA interference bude těžištěm jedné z úloh praktika.

PROJEKT 2: Specifické *in vivo* značení proteinů v *Giardia intestinalis* pro jejich afinitní purifikaci a proteomickou analýzu.

Úspěšná proteomická analýza buněčných organel či proteinových komplexů závisí na kvalitě purifikačního postupu, kterým si připravíme analyzovaný vzorek. V tomto experimentu využijeme metody označení hledaných proteinů pomocí biotinylace ještě uvnitř buňky *Giardia intestinalis*, čímž se vyhneme pracné a mnohdy i prakticky neuskutečnitelné purifikaci malých buněčných organel. Tato metoda vychází ze zcela nově vyvinuté metody založené na promiskuitní aktivitě mutované biotin ligázy tzv. BioID, která naváže biotinový zbytek na všechny proteiny ve svém okolí. Po hrubé buněčné frakcionaci budou biotinylované proteiny afinitně purifikovány na streptavidinové koloně a analyzovány pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie.

PROJEKT 3: Bakteriální sekreční systém (T2SS) v mitochondrii *Naegleria gruberi*.

U gram-negativních (mezi které patřil i předchůdce dnešní mitochondrie) existuje několik typů sekrečních systémů, jejichž prostřednictvím jsou proteiny dopravovány do extracelulárního prostoru či přímo do cílové buňky. Sekreční systém typu 2 umožňuje například transport efektorových proteinů enteropatogenní *Escherichia coli*.

V genomu prvoka *Naegleria gruberi* byly nalezeny homologní proteiny pro tento sekreční systém, o kterém předpokládáme, že by mohl představovat minimalistický mitochondriální exportní aparát. Naším cílem bude objasnit způsob importu a skládání jednotlivých komponent tohoto systému v mitochondriích pomocí *in vitro* importu proteinů do izolovaných mitochondrií. Pomocí této úlohy se studenti naučí, jak izolovat buněčné organely a dále s nimi pracovat a také, jak naznačit studovaný protein a testovat jeho import do izolovaných organel.

Kontakt: pavel.dolezal@natur.cuni.cz