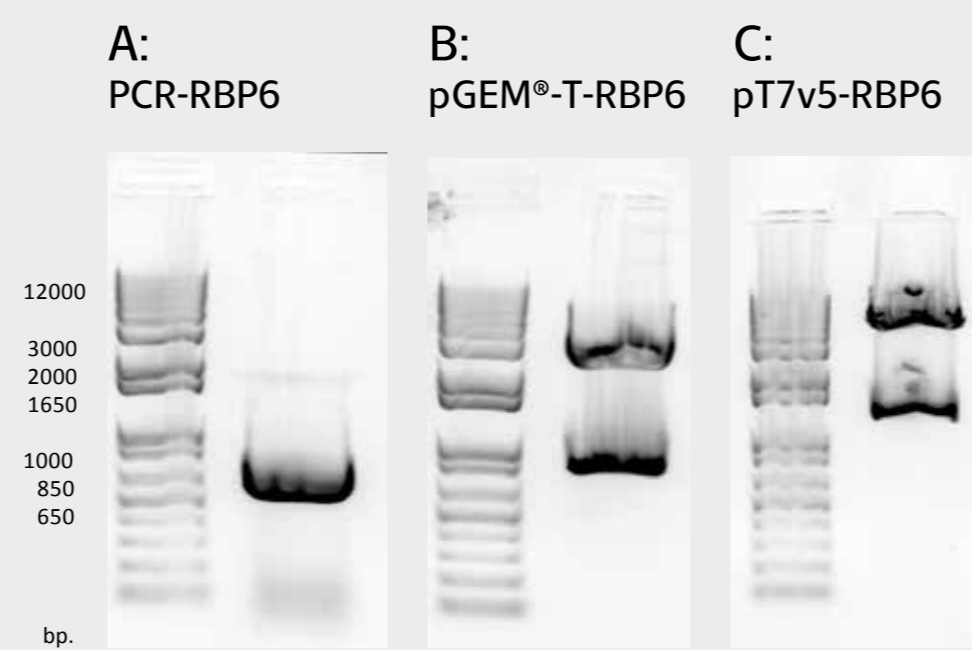
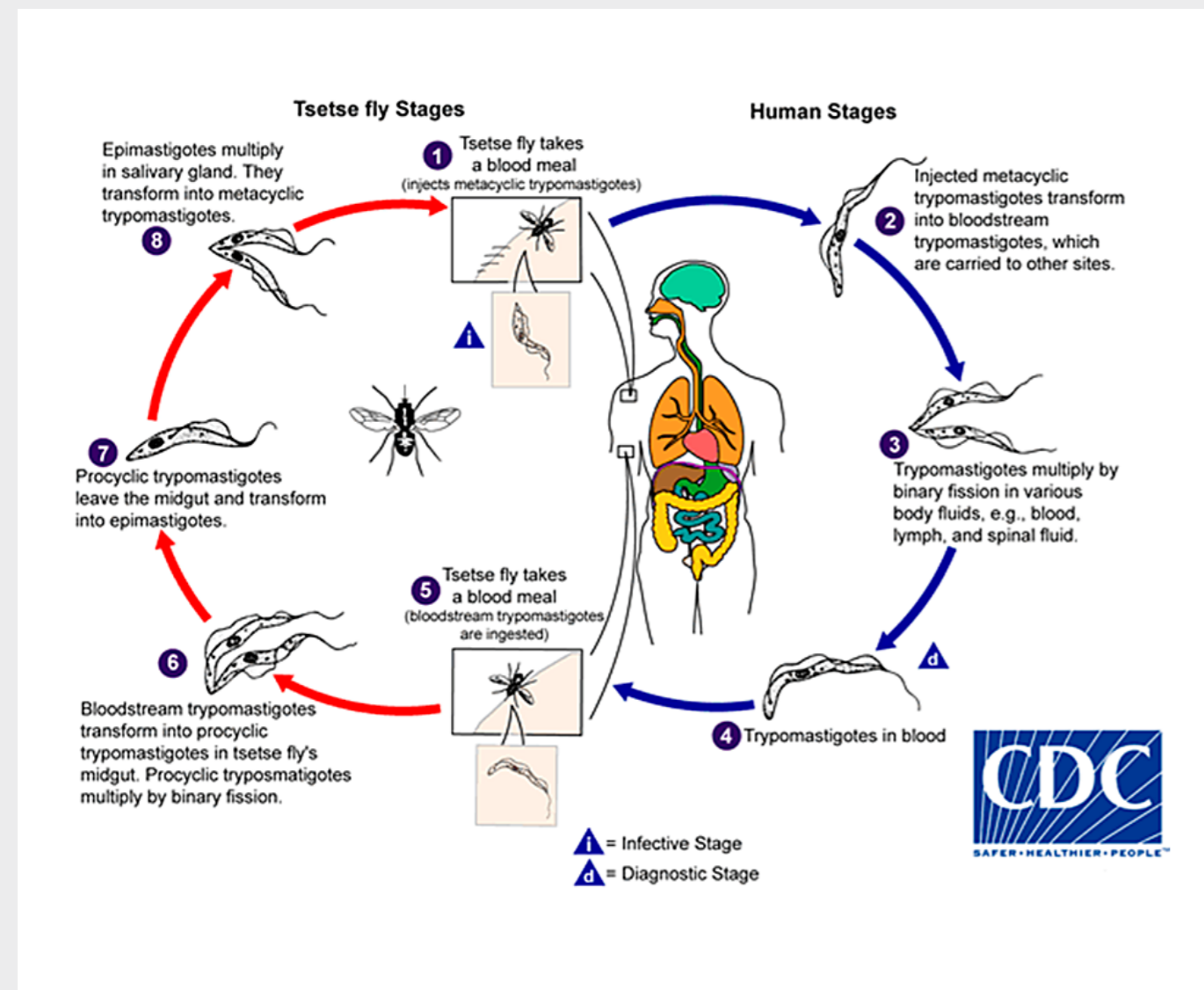




Overexprese genu RBP6 stimuluje diferenciaci *Trypanosoma brucei*

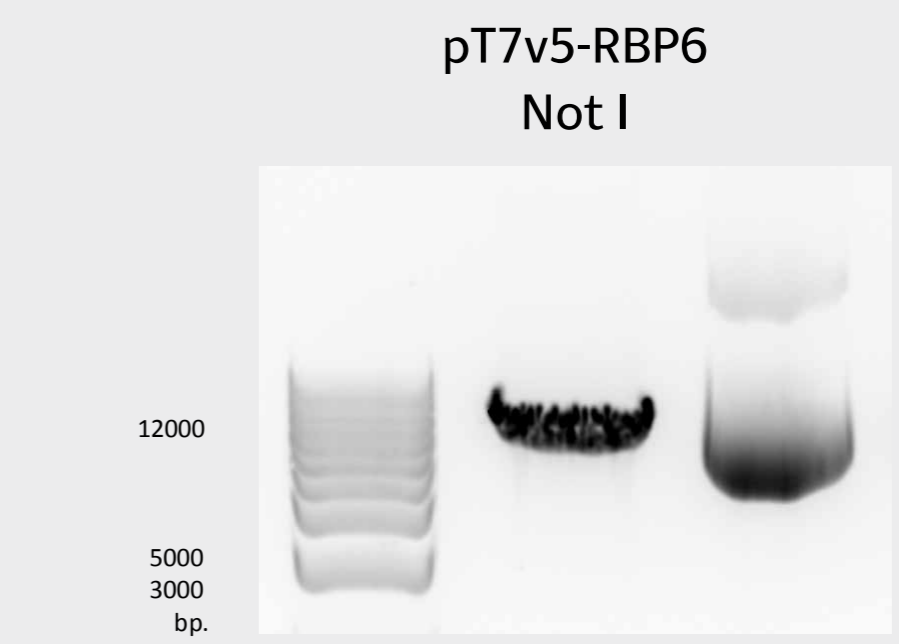
Úvod

Trypanozoma spavičná a dobytčí (*Trypanosoma brucei* spp.) patří mezi parazitické prvky, kteří způsobují infekční onemocnění člověka a jiných obratlovců (př. spavá nemoc či nana). Ve svém životním cyklu střídá *T. Brucei* dvě odlišná prostředí - savčího hostitele a mouchu tse-tse (*Glossina* spp.). Buňka trypanozom v závislosti na životním cyklu a typu hostitele mění své morfologické znaky. Tyto proměny jsou řízeny specifickou expresí řady genů. Mezi tyto geny patří i RBP6, jehož overexprese u procyklických buněk (vyskytujících se v trávicím traktu mouchy tse-tse) vede k přeměně na další typy buněk, které se nacházejí ve slinných žlázách mouchy (př. epimastigotní a metacyklický typ buněk).



Amplifikace a klonování genu RBP6

A: PCR amplifikace genu RBP6 z genomové DNA trypanozomy. B: Ověření zaklonování PCR produktu do vektoru pGEM®-T Easy pomocí restriktivního enzymu NotI. C: Ověření zaklonování RBP6 do vektoru pT7v5-N term. Tento plasmid nese v5 tag, který je po vložení RBP6 genu přidán na jeho N-konec a dále slouží k detekci rekombinantního RBP6.

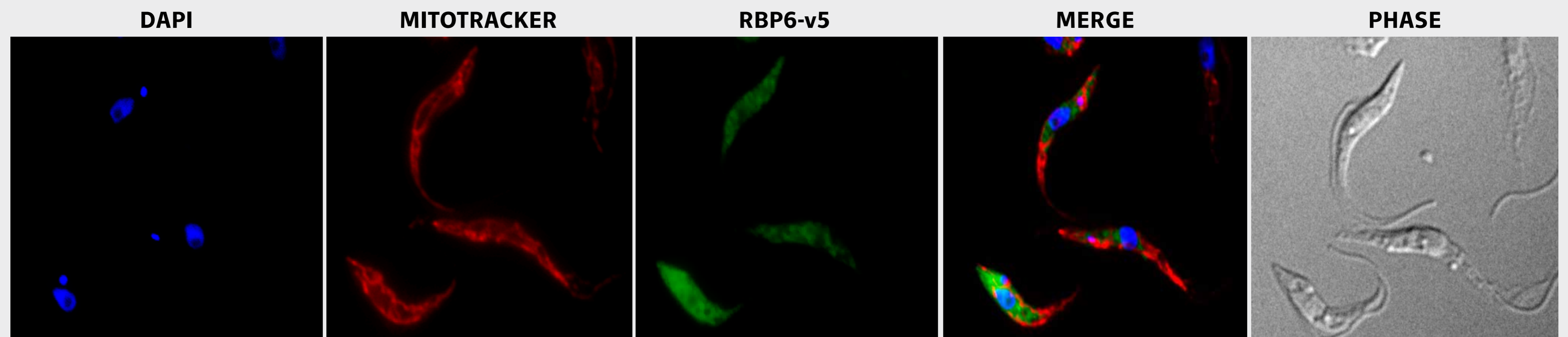
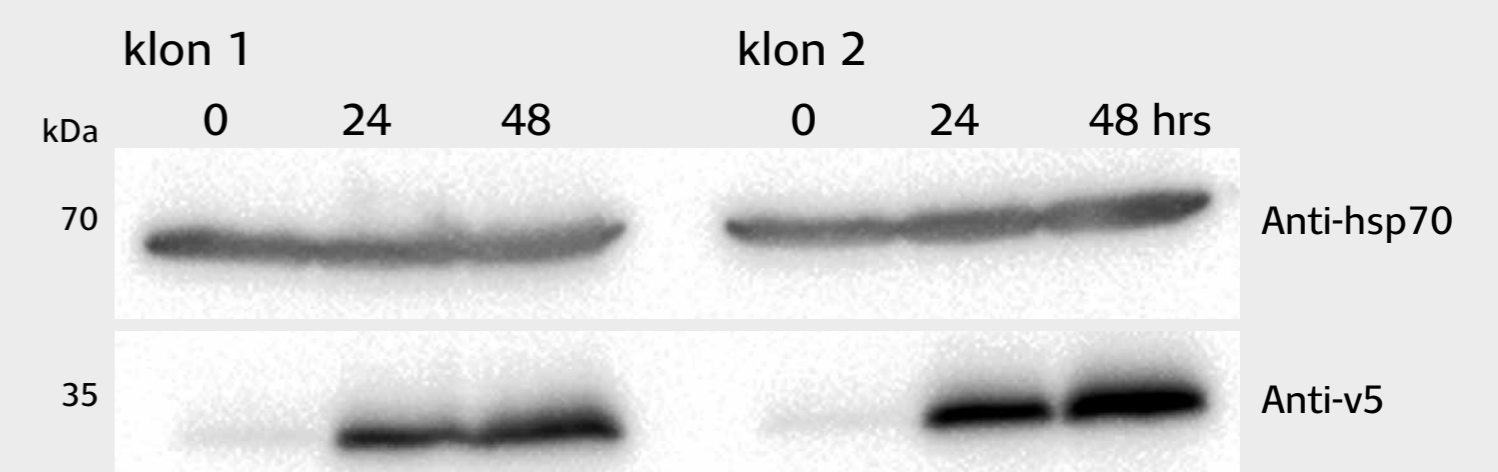


Příprava pT7v5-RBP6 na transfekci

Pro transfekci do procyklických buněk trypanozom byl plasmid pT7v5-RBP6 rozštěpen restriktivním enzymem NotI. - kontrolní neštěpený pT7v5-RBP6 plasmid.

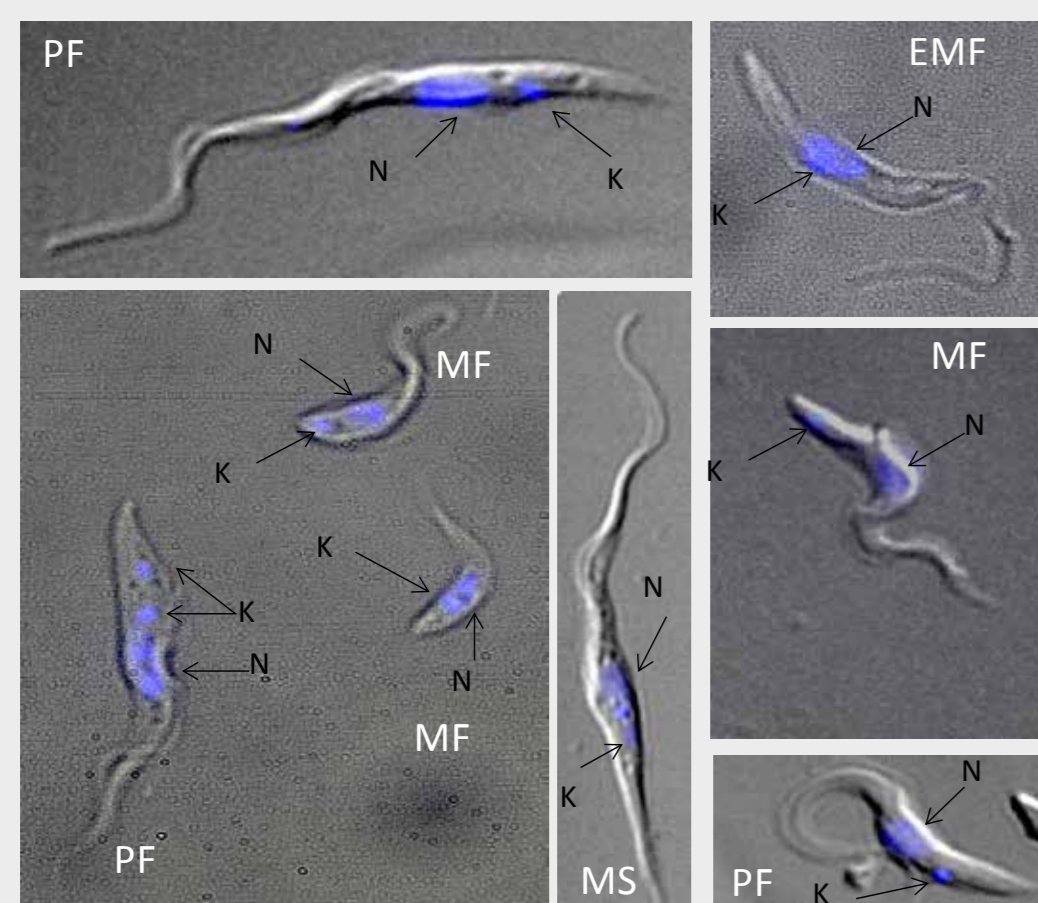
Ověření exprese RBP6 v procyklické kultuře trypanozom

Po transfekci procyklických buněk vektorem pT7v5-RBP6 bylo vyselektováno několik klonů. Tyto klony byly testovány na produkci RBP6 při indukci tetracyklínem po 24 a 48 hodinách. Pomocí Westernu byla detekována exprese RBP6 protilátkou anti-v5. Jako kontrola byla použita protilátka anti-hsp70.



Imunolokalizace RBP6

Overexprimovaný RBP6 byl lokalizován pomocí IFA v cytoplasmě. Jádra a kinetoplasty byly vizualizované pomocí barvení DAPI, mitochondrie pomocí barvení in vivo červeným fluorescenčním barvivem (mitotracker). Morfologie buněk byla pozorována pomocí fázového kontrastu.



Morfologie buněk overexprimujících RBP6

Pozice a orientace kinetoplastu je klíčovým znakem, kterým se dají rozlišit různá stádia trypanozom. V původní procyklické kultuře, kde je overexprimován gen RBP6, jsou pozorovatelná i formy podobné epimastigotní či metacyklické.

PF procyklická forma
MS mesocyklická forma
EMS epimastigote-like forma
MF metacyklická forma
N, nucleus; K, kinetoplast

Závěr

- Úspěšně jsme amplifikovali a zaklonovali gen RBP6.
- Transfekovali jsme RBP6 do procyklické kultury *Trypanosoma brucei* br.
- Exprimovali jsme RBP6 v procyklické kultuře.
- Lokalizovali jsme RBP6 v cytosolu pomocí IFA.
- Detekovali jsme různá stádia trypanozom v důsledku overexprese genu RBP6.

Literatura

Kólev NG, Ramey-Butler K, Cross GA, Ullu E, Tschudi C (2012) Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. *Science* 338: 1352–1353
<http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>