

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Parazitologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Alžběta Johánková

**Charakterizace faktorů biogeneze endoplazmatického retikula
u *Giardia intestinalis***

**Characterization of the components involved in the biogenesis
of the endoplasmic reticulum in *Giardia intestinalis***

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Doležal, PhD.

Praha, 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Pavla Doležala, PhD. a že jsem uvedla všechnu použitou literaturu. Dále prohlašuji, že tuto práci ani její část jsem nepoužila k získání jiného akademického titulu.

V Praze, 7. 8. 2024

Alžběta Johánková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit velký dík svému školiteli Pavlu Doležalovi za jeho trpělivost, za to, že důvěřoval ve mě a v moje schopnosti a že mi umožnil výjezd na stáž. Obrovský dík patří taky Martinu Bendovi, který mě zasvětil do tajů laboratorní a vědecké práce a mohla jsem se na něj kdykoliv obrátit a s velkou dávkou trpělivosti mi pomohl. Chtěla bych poděkovat také Vladěce Najdrové, která ve mně probudila nadšení pro celou problematiku GET dráhy a která mě podporovala během nejnáročnějších experimentů jak vědecky, tak i lidsky. Velikánský dík patří všem z naší laborky, které považuju nejen za kolegy, ale i za přátele, protože mi vždy pomohli a ještě u toho byla zábava. Největší dík ale patří mým nejbližším přátelům a mé rodině, protože ti mě vždy podporovali a stáli při mně i ve chvílích, kdy to jistě nebylo jednoduché.

Abstrakt

Anaerobní prvok *Giardia intestinalis* je nejčastějším střevním parazitem člověka. Parazitický způsob života a evoluční odlišnost vedly u *G. intestinalis* k pozoruhodným adaptacím buněčných kompartmentů a metabolických drah. Z tohoto důvodu představuje *G. intestinalis* unikátní modelový organismus pro studium evoluce základních buněčných drah. Tou je i Guided Entry of Tail-anchored proteins (GET) dráha, která u eukaryot zaručuje post-translační vkládání tzv. tail-anchored (TA) proteinů do endoplazmatického retikula (ER). Pro TA proteiny je charakteristická C-terminální transmembránová doména, která zároveň působí jako targetovací sekvence pro transport do membrány ER. Mezi funkce TA proteinů patří fúze membrán, translokace proteinů či regulace apoptózy. GET dráha je nejlépe charakterizovaná u kvasinek a savců, avšak téměř všechny její komponenty již byly identifikovány i u *G. intestinalis*. Malá pozornost však byla dosud věnována proteinu Get1, který figuruje v konečných krocích GET dráhy jako inzertáza. U *G. intestinalis* se jedná o jediného zástupce tzv. Oxal superrodiny inzertáz, které zajišťují ko- i post-translační inzerci proteinů do membrán organel. Proto je Get1 hlavním tématem této diplomové práce.

Klíčová slova: *Giardia intestinalis*, Guided Entry of Tail-anchored proteins, tail-anchored proteiny, endoplazmatické retikulum, Get1, pull-down, knock-out

Abstract

The anaerobic protist *Giardia intestinalis* is the most common intestinal parasite of human. Parasitic life style and evolutionary divergence have led to remarkable adaptations of cellular compartments and metabolic pathways in *G. intestinalis*. For this reason, *G. intestinalis* represents a unique model organism for studying the evolution of fundamental cellular pathway that plays a key role in the post-translational insertion of tail-anchored proteins (TAs) to the endoplasmic reticulum (ER) in eukaryotes called Guided Entry of Tail-anchored proteins (GET) pathway. TAs carry a single C-terminal transmembrane domain which also serves as a targeting sequence for the insertion to the ER membrane. TA protein functions include membrane fusion, protein translocation and regulation of apoptosis. GET pathway is well studied in yeast and mammals but almost all of the GET pathway components have been identified in *G. intestinalis*. However, not much attention was paid to Get1 protein which plays part in the final steps of GET pathway as the membrane insertase. It is also the only member of Oxa1 superfamily of insertases found in *G. intestinalis* which are mediating co- and post-translational insertion of proteins to organelle membranes. That makes Get1 the main topic of this thesis.

Key words: *Giardia intestinalis*, Guided Entry of Tail-anchored proteins, tail-anchored proteins, endoplasmic reticulum, Get1, pull-down, knock-out

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. <i>Giardia intestinalis</i>	2
2.1.1. Buněčná stavba.....	2
2.1.2. <i>G. intestinalis</i> jako modelový organismus.....	4
2.2. Integrální membránové proteiny.....	4
2.2.1. Tail-anchored (TA) proteiny.....	5
2.3. Post-translační translokace membránových proteinů.....	6
2.3.1. Guided Entry of Tail-anchored proteins (GET) dráha.....	6
2.3.2. Oxa1 superrodina inzertáz – Get1, EMC3, TMCO1.....	14
2.3.3. EMC komplex.....	16
2.3.4. SND komplex.....	19
2.3.5. Post-translační translokace u <i>G. intestinalis</i>	20
3. Cíle práce.....	22
4. Materiály a metodika.....	23
4.1. Použité organismy a jejich kultivace.....	23
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	23
4.1.2. <i>Giardia intestinalis</i>	23
4.2. Použité roztoky a chemikálie.....	25
4.2.1. Použité protilátky.....	26
4.3. Použité plazmidy.....	27
4.4. Základní laboratorní metody.....	30
4.4.1. Amplifikace DNA.....	30
4.4.2. Izolace DNA z agarózového gelu.....	31
4.4.3. Klonování.....	31
4.4.4. Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i>	32
4.4.5. Ověření pozitivních klonů po transformaci.....	33
4.4.6. Transfekce buněk <i>G. intestinalis</i>	34
4.4.7. Potvrzení exprese v transfekovaných buňkách <i>G. intestinalis</i>	34
4.4.8. Izolace gDNA.....	34
4.4.9. Stanovení koncentrace proteinů.....	36
4.4.10. SDS-polyakrylamid gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	36

4.4.11.	Imunoblot	36
4.4.12.	Imunofluorescenční mikroskopie	37
4.4.13.	Fluorescenční mikroskopie a zpracování fotografií	38
4.5.	Laboratorní metody specificky využívané pro charakterizaci Get1	38
4.5.1.	Overexprese Get1-BAP	38
4.5.2.	Knock-out genu <i>get1</i>	41
4.5.3.	Tvorba CRISPR/Cas9 rezistentního konstruktů	48
5.	Výsledky	50
5.1.	Overexprese Get1-BAP	50
5.1.1.	Tvorba buněčné linie Get1-BAP v BirA	50
5.1.2.	Potvrzení lokalizace Get1-BAP v endoplazmatickém retikulu	50
5.1.3.	Hledání optimální koncentrace DSP pro chemický cross-linking	52
5.1.4.	Hledání interakčních partnerů Get1 pomocí pull-down experimentu	53
5.1.5.	Nalezení dalšího kandidátního EMC proteinu	57
5.2.	Knock-out genu <i>get1</i>	58
5.2.1.	Příprava konstruktů pro genový knock-out	58
5.2.2.	Tvorba buněčné linie Δ Get1	58
5.2.3.	Potvrzení odstranění genu <i>get1</i>	59
5.2.4.	Charakterizace knock-outové linie Δ Get1	62
5.3.	Add-back genu <i>get1</i>	70
5.3.1.	Tvorba buněčné linie Get1-V5 in Δ Get1	70
5.3.2.	Potvrzení navrácení fenotypu	71
6.	Diskuze	74
7.	Závěr	80
8.	Seznam použitých zkratk	81
9.	Seznam použité literatury	84
10.	Seznam příloh	101

1. Úvod

Giardia intestinalis je parazitem lidského střeva člověka a dalších organismů a způsobuje onemocnění zvané giardióza, se kterým se lze setkat jak v rozvojových, tak i v rozvinutých zemích. Jedná se o prvoka s unikátní a minimalistickou buněčnou stavbou, která je způsobena sekundárním zjednodušením vlivem parazitického způsobu života. *G. intestinalis* postrádá některé orgány, jako jsou Golgiho aparát, peroxisomy či lysozomy a u tohoto parazita lze také pozorovat redukované mitochondrie, známé jako mitosomy. Velkou část buňky pak zabírá rozsáhlé endoplazmatické retikulum (ER), ve kterém se odehrává mnoho buněčných pochodů. S ER je také spjatá tzv. Guided Entry of Tail-anchored proteins (GET) dráha, jež je evolučně konzervovanou drahou napříč eukaryoty a představuje jednu z posledně popsaných protein-transportních drah u eukaryot. Konkrétně tato dráha zajišťuje post-translační inzerci tzv. tail-anchored (TA) proteinů do membrány ER a byla popsána u kvasinek a řady mnohobuněčných organismů (Borgese & Fasana, 2011; Schuldiner et al., 2008). GET dráha je tvořena několika solubilními i membránovými proteiny, jež byly v poslední době identifikovány i u *G. intestinalis* (Najdrová, 2022). Posledním článkem zbývajícím pro úplnou charakterizaci GET dráhy u tohoto prvoka byl membránový protein Get1, jehož charakterizace byla hlavní náplní této práce.

Hlavním cílem této práce bylo objasnit roli Get1 v GET dráze na modelu *G. intestinalis*. Naším záměrem bylo nejen objasnit specifickou roli tohoto proteinu v biologii parazita, ale i využít jeho buněčný systém pro pochopení obecné role proteinu Get1 v transportu TA proteinů a jeho interakce s dalšími buněčnými procesy. Za tímto účelem jsme zvolili dva nezávislé experimentální přístupy: (i) identifikace interakčních partnerů Get1 a (ii) vytvoření buněčné linie postrádající Get1. Kombinací těchto experimentů s metodami buněčné biologie se nám podařilo identifikovat překvapivou interakci GET dráhy s podjednotkami EMC komplexu, o kterém se dlouho předpokládalo, že se u *G. intestinalis* nevyskytuje. Tato práce navazovala na předchozí projekt charakterizace GET dráhy vypracovaný v naší laboratoři Mgr. Vladimírou Najdrovou, PhD. Výsledky získané v této diplomové práci poslouží jako základ pro budoucí publikaci na téma evoluce a funkce GET dráhy u eukaryot.

2. Literární přehled

2.1. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je parazitický anaerobní prvek náležící do řádu Diplomonadida a skupiny Metamonada (Burki et al., 2020). Jedná se o parazita tenkého střeva člověka a dalších savčích hostitelů. Podle hostitelské specifity a genetické variability je druh *G. intestinalis* rozdělen do osmi asembláží (A-H), přičemž u člověka se vyskytují pouze parazité náležící do asembláží A a B (Monis et al., 2009).

Životní cyklus *G. intestinalis* zahrnuje dvě stádia – infekční cystu a pohyblivého trofozoita. K nákaze hostitele dochází tlustostěnnou cystou alimentárně či orálně-fekálním přenosem. Po pozření cysty dochází při průchodu kyselým prostředím trávicího traktu k zahájení excystace, která probíhá v duodenu. Trofozoiti se následně množí podélným dělením v oblasti tenkého střeva a pomocí tzv. ventrálního disku se přichycují ke střevní stěně, odkud přijímají potravu. Vlivem zvýšeného pH v dolní části trávicího traktu pak dochází k encystaci a *G. intestinalis* následně ve formě cyst opouští tělo hostitele, přičemž uvolněné cysty jsou okamžitě infekční (Ankarklev et al., 2010; Einarsson et al., 2016). Během životního cyklu se také proměňuje ploidie parazita, která se pohybuje od 4N u trofozoitů až k 16N u cyst (Bernander et al., 2001).

Infekce *G. intestinalis* se nazývá giardióza a lze se s ní setkat jak v rozvojových, tak ve vyspělých zemích. Průběh nákazy může být symptomatický i asymptomatický (Ish-Horowicz et al., 1989). V České republice se u asymptomatických jedinců můžeme setkat se 7% prevalencí (Brožová et al., 2023). Klinický obraz onemocnění zahrnuje úporné průjmy, steatoreu, meteorismus či bolest v epigastriu (Hanevik et al., 2009; Vlad, 2018). Po několika týdnech obvykle nákaza sama odezní, ve výjimečných případech pak může vést k chronickým onemocněním a syndromu dráždivého tračníku (IBS) (Hanevik et al., 2014).

2.1.1. Buněčná stavba

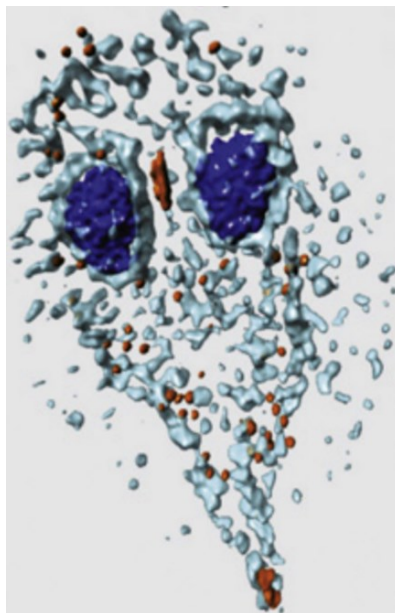
G. intestinalis je výjimečným organismem i z hlediska buněčné kompozice. Buněčná stavba tohoto prvoka je zjednodušená nejen kvůli parazitickému způsobu života, ale i kvůli výrazné evoluční divergenci (Dacks et al., 2002; Embley & Hirt, 1998).

Pro buňku trofozoitů je charakteristický kapkovitý tvar a diplozoické uspořádání – orgány se v buňce nachází ve dvou sadách. Typická jsou pro *G. intestinalis* dvě jádra, která se i přes podobnou morfologii liší množstvím genetické informace, kterou obsahují. Každé z jader může vlivem aneuploidie a genových delecí obsahovat jiný počet chromozomů a jiné množství genů (Tůmová et al., 2007, 2016). Jádro spolu s axonemami a bazálními tělísky bičíků tvoří tzv. karyomastigont. *G. intestinalis* má čtyři páry bičíků – anterolaterální, posterolaterální, ventrální a kaudální. Axonemy bičíků mají klasickou mikrotubulovou „9+2“ strukturu (Nohýnková et al., 2006). Mikrotubuly je tvořena i výrazně specifická cytoskeletární struktura v buňkách *G. intestinalis* – ventrální **přísavný disk**. Přísavný disk slouží trofozoitům k přichycení se na střevní stěnu hostitele a je unikátní nejen napříč „běžnými“ eukaryoty, ale i napříč všemi známými diplomonádami (Holberton, 1973). Buňky trofozoitů obsahují ještě další specifickou cytoskeletární strukturu, kterou jsou **mediální tělíska**. Jejich

funkce doposud nebyla plně objasněna, ale převažuje názor, že by mohla fungovat jako organizační centrum mikrotubulů (Elmendorf et al., 2003; T. C. Meng et al., 1996).

U tohoto parazita také najdeme výrazně redukované mitochondrie označované jako **mitosomy** (Tovar et al., 2003). Mitosomy na rozdíl od klasických, aerobních mitochondrií nedisponují vlastním genomem a také ztratily veškeré metabolické dráhy až na jedinou, kterou je syntéza tzv. železo-sírných center. Ta jsou důležitá např. pro správnou funkci některých enzymů (Jedelský et al., 2011; Martincová et al., 2015).

Pro *G. intestinalis* je typický výrazně redukovaný endomembránový systém. Postrádá klasický Golgiho aparát (GA), peroxisomy či lysozomy (Faso & Hehl, 2011). Velmi výraznou organelou endomembránového systému u *G. intestinalis* je endoplazmatické retikulum (**ER**) (Obr.1). ER se rozprostírá téměř po celé buňce jako síťovitá struktura tvořená mnoha malými cisternami (Soltys et al., 1996). Mohlo by se zdát, že absencí GA bude postižen vezikulární transport proteinů, ukazuje se však, že *G. intestinalis* se na tuto ztrátu dokonale adaptovala a ER se zde podílí jak na syntéze proteinů, tak do jisté míry i na endocytóze a degradaci endocytovaných extracelulárních proteinů. Pravděpodobně tak ER bylo schopné převzít do jisté míry i funkci GA (Abodeely et al., 2009; Faso & Hehl, 2011; Zamponi et al., 2017). Endo- i exocytické procesy jsou však hlavní funkcí tzv. periferních vakuol (**PV**) (Cernikova et al., 2018). PV jsou statické váčky, které se na jedné straně mohou otevírat směrem k buněčnému povrchu a na druhém konci interagují právě s ER. Svou funkcí připomínají lysozomy, neboť stejně jako u lysozomů má obsah těchto vakuol kyselé pH. Hlavní funkcí PV je třídění a denaturace endocytovaných proteinů, dále neutralizace zásaditých částic, se kterými *G. intestinalis* přijde do styku v tenkém střevě hostitele a následná exocytóza nevyužitých či potenciálně škodlivých látek. (Abodeely et al., 2009; Lanfredi-Rangel et al., 1998; Zumthor et al., 2016).



Obr. 1 – Schéma rozmístění ER v buňkách trofozoitů *G. intestinalis*. ER (světle modře) vyplňuje jako síť velkou část buňky. Tmavě modře jsou označena jádra, hnědě pak mitosomy. Převzato z (Faso & Hehl, 2011).

Celý povrch buňky trofozoita je pokryt ochrannou vrstvou složenou z tzv. variant surface proteinů (VSP), které pravděpodobně zajišťují únik parazita před imunitní odpovědí hostitele. Existuje mnoho typů VSP, z nichž je na povrchu parazita v daný okamžik produkován vždy pouze jeden (Nash & Mowatt, 1992; Svärd et al., 1998).

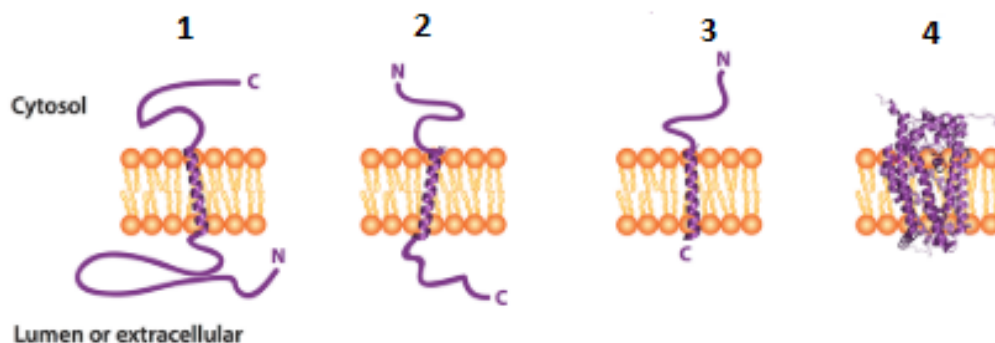
2.1.2. *G. intestinalis* jako modelový organismus

Mimo medicínální a veterinární význam je *G. intestinalis* zkoumána také z molekulárně-biologického a evolučního hlediska. Původní hypotézy navrhovaly, že zjednodušená buněčná stavba je způsobena bazálním postavením tohoto prvoka na evolučním stromu eukaryot. Ukazuje se však, že k tomuto zjednodušení došlo spíše sekundárně kvůli parazitickému a anaerobnímu způsobu života (Dacks et al., 2002; Embley & Hirt, 1998).

Výhodou výzkumu *G. intestinalis* je poměrně nenáročná kultivace tohoto prvoka a možnost navození excystace i encystace *in vitro* (Gillin et al., 1989; Keister, 1983). Nejčastěji studovaný je kmen WB c6 z assembláže A, jehož genom byl prvním osekvenovaným genomem *G. intestinalis* (Morrison et al., 2007) a jehož genomová sekvence byla nedávno upřesněna (F. Xu et al., 2020). Pro genetickou manipulaci s *G. intestinalis* se využívá transfekce plazmidové DNA a následná selekce antibiotiky (Singer et al., 1998; Sun et al., 1998; Yee & Nash, 1995). V rámci funkčních studií tohoto parazita je využívána řada genetických nástrojů – k dočasnému utlumení genové exprese byl použit CRISPR/Cas9 systém (Z. Q. Lin et al., 2019; McNally et al., 2019). K blokaci translace některých genů byly také použity morfolino oligonukleotidy (Carpenter & Cande, 2009). Prvního úspěšného odstranění genu u *G. intestinalis* bylo docíleno pomocí Cre/loxP systému (Ebner et al., 2016), avšak v nedávné době byl zaveden efektivní způsob odstranění genu ve všech čtyřech alelách pomocí CRISPR/Cas9 systému (Horáčková et al., 2022).

2.2. Integrální membránové proteiny

Zhruba 25 % z celkového množství proteinů v eukaryotických buňkách tvoří membránové proteiny (Hegde & Keenan, 2022). Najdeme je nejen v cytoplazmatické membráně, ale i v endomembránovém systému buňky a podle jejich topologie je můžeme rozdělit do několika skupin: **1)** membránové proteiny s jednou transmembránovou doménou (TMD) s orientací konců „C-in, N-out“ (typ I); **2)** membránové proteiny s jednou TMD s orientací konců „C-out, N-in“ (typ II); **3)** tzv. tail-anchored (TA) proteiny, jejichž TMD je umístěna na C-konci a N-konec směřuje do cytosolu a **4)** polytopické membránové proteiny s několika TMD (Obr. 2) (Borgese et al., 2019; Hegde & Keenan, 2022).



Obr. 2 – Typy membránových proteinů. 1) Proteiny s jednou TMD s orientací „C-in, N-out“; 2) proteiny s jednou TMD s orientací „N-in, C-out“; 3) tail-anchored (TA) proteiny; 4) polytopické proteiny s několika TMD. Převzato a upraveno podle (Borgese et al., 2019).

Transport a správné složení membránových proteinů s sebou přináší několik úskalí. Jedná se o energeticky náročný proces, který často vyžaduje aktivitu molekulárních chaperonů. Nestabilita hydrofobních TMD ve vodním prostředí cytosolu vede k agregaci proteinů a jejich vyřazení z funkčního cyklu (Cho et al., 2024; Tector & Hartl, 1999). Komplikace se objevují i při samotném vkládání TMD do membrány ER - délka TMD nemusí odpovídat šířce membrány ER, neboť v cílové destinaci může mít membrána jiné charakteristiky (Sharpe et al., 2010). Pro funkci membránových proteinů je navíc zásadní jejich správná topologie, která je ovlivněna okolními membránovými proteiny i nábojem na obou stranách membrány (Anghel et al., 2017). Špatně složené membránové proteiny jsou často neslučitelné se životem organismu nebo se projevují jako závažná onemocnění, jako je např. cystická fibróza či onemocnění zraku *retinitis pigmentosa* (Shurtleff et al., 2018; Tector & Hartl, 1999).

Většina membránových proteinů je během jejich biogeneze vložena nejdříve do membrány ER, odkud jsou pak transportovány do jejich cílové lokalizace. Translokace membránových proteinů může probíhat dvěma způsoby, a to buď ko-translačně, nebo post-translačně (Deshaies & Schekman, 1987). Ko-translačně mohou být transportovány membránové proteiny typu I, typu II a polytopické proteiny. Ve velké většině případů je ko-translační translokace závislá na tzv. signal recognition particle (SRP), která zprostředkovává transport membránového proteinu k translokonu v membráně ER (Keenan et al., 2001). U skupiny TA proteinů však ko-translační transport kvůli jejich topologii není možný, a proto mohou být transportovány pouze post-translačně (Borgese et al., 2003).

2.2.1. Tail-anchored (TA) proteiny

TA proteiny tvoří 3-5 % z celkového proteomu buňky a jedná se o skupinu integrálních membránových proteinů s prostou topologií (Cho et al., 2024; Kutay et al., 1993; Rao et al., 2016). Na N-konci se nachází cytosolická doména a jako targetovací sekvence pro translokaci do membrány ER slouží jediná TMD, která se nachází na C-konci. Za ní může následovat krátký úsek lumenální sekvence, který není delší než 30 aminokyselin (AK) (Borgese et al., 2003; Kutay et al., 1993). Tato unikátní orientace TA proteinů však vyžaduje speciální způsob transportu, neboť C-terminální targetovací sekvence se v momentě ukončení translace stále nachází v ribozomu a nemůže být proto navázána na SRP částici pro ko-translační transport do membrány ER. Proto jsou TA proteiny translokovány až post-translačně (Borgese et al., 2003; Yabal et al., 2003).

Délka a hydrofobicita TMD má vliv na cílovou destinaci TA proteinu. Proteiny s dlouhou a více hydrofobní TMD jsou transportovány na cytoplazmatickou membránu, proteiny se střední délkou a hydrofobicitou TMD směřují do endoplazmatického retikula a krátké a slabě hydrofobní TMD jsou rozeznávány jako signál pro transport TA proteinu do vnější membrány mitochondrií. Hydrofobicita TMD také určuje způsob translokace TA proteinů – zatímco TMD s vysokou hydrofobicitou jsou transportovány do membrány ER pomocí tzv. GET dráhy, TMD vykazující nižší hydrofobicitu jsou transportovány přes tzv. EMC

komplex (Borgese et al., 2003; Costello et al., 2017; Hegde & Keenan, 2022; Kalbfleisch et al., 2007). Oba zmíněné mechanismy translokace budou popsány v následujících kapitolách. Ukazuje se však, že tyto dvě dráhy se pravděpodobně mohou překrývat, neboť TA protein Sec61 β , podjednotka Sec translokony v ER, vykazuje závislost na obou zmíněných drahách (Guna et al., 2018). Kromě výše zmíněných možných lokalizací se TA proteiny nacházejí i v membránách dalších organel, jako jsou peroxisomy (Elgersma et al., 1997), GA (Kohl et al., 2011), či jaderný obal (Manilal et al., 1996). Při translokaci jsou většinou nejdříve vloženy do membrány ER, odkud jsou následně vezikulárním transportem doručeny do finální destinace. Kromě vnější membrány mitochondrií se TA proteiny nacházejí také v thylakoidní membráně chloroplastů (Mozdy et al., 2000; Von Loeffelholz et al., 2011). V obou případech jsou TA proteiny vkládány přímo z cytosolu, přičemž není známo, jaké faktory se tohoto procesu účastní (Borgese et al., 2003; Chartron, Clemons, et al., 2012).

Mezi významné TA proteiny patří proteiny zajišťující vezikulární transport a fúzi membrán, jako jsou soluble N-ethylmale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors (**SNARE**), vesicle-associated membrane proteins (**VAMP**) či VAMP-associated proteins (**VAP**). Řada dalších TA proteinů se pak účastní stabilizace větších membránových komplexů nebo fungují jako receptory pro proteiny transportované z cytosolu do dalších buněčných kompartmentů. Např. **Sec61 β** či **Sec61 γ** patří mezi podjednotky Sec translokony, který zajišťuje ko-translační vkládání membránových proteinů do membrány ER. TA proteiny **TOM5**, **TOM6**, **TOM7** či **TOM22** se jako podjednotky TOM komplexu podílí na importu proteinů do mitochondrií. Ve vnější membráně chloroplastů se pak nacházejí podjednotky TOC translokázy **TOC33** či **TOC34**. Do skupiny TA proteinů patří také **cytochrom b₅**, **cytochrom P450** nebo **hem oxygenáza**, které zajišťují přenos elektronů. V neposlední řadě mezi TA proteiny také patří proteiny tzv. **Bcl-2** rodiny regulující proces apoptózy v buňce (Borgese et al., 2003; Leznicki et al., 2010; Rao et al., 2016; Wattenberg & Lithgow, 2001).

Podobně jako u ostatních eukaryot, řada TA proteinů byla identifikována i u *G. intestinalis*, ať už se jedná o SNARE proteiny nebo o další funkční skupiny proteinů (Elias et al., 2008; Fry et al., 2022).

2.3. Post-translační translokace membránových proteinů

Nejčastějším způsobem translokace TA proteinů je tzv. **GET dráha**. V této kapitole budou zmíněny i dva další systémy – **EMC komplex** a **SND komplex**. GET dráha zprostředkovává výlučně post-translační transport TA proteinů, zatímco EMC a SND komplex umožňují kromě post-translačního transportu TA proteinů i ko-translační transport polytopických membránových proteinů (Aviram et al., 2016; Chitwood et al., 2018; Schuldiner et al., 2008).

2.3.1. Guided Entry of Tail-anchored proteins (GET) dráha

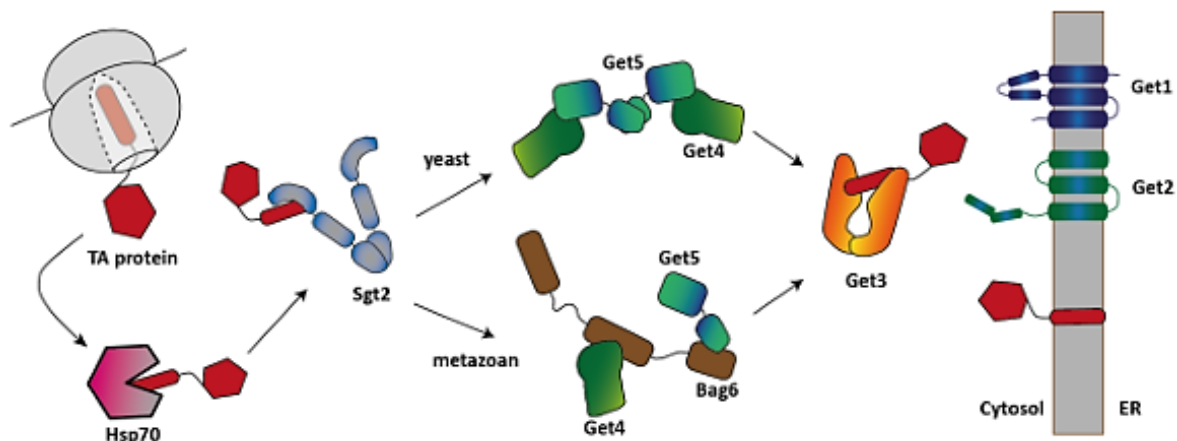
GET dráha je vysoce evolučně konzervovanou drahou pro transport TA proteinů, která byla poprvé popsána u *Saccharomyces cerevisiae* (Schuldiner et al., 2008). V posledních 15 letech byla popsána kromě kvasinek i u mnohobuněčných organismů, kde nese název Transmembrane domain Recognition Complex (**TRC**) (Borgese & Fasana, 2011). Některé komponenty GET dráhy byly popsány i u rostliny *Arabidopsis thaliana* ze superskupiny

Archaeplastida (Stefanovic & Hegde, 2007; Xing et al., 2017) a u jednobuněčných parazitů *Plasmodium falciparum* patří do skupiny Apicomplexa (superskupina SAR) (Kumar et al., 2021) a *G. intestinalis* ze skupiny Metamonada (superskupina Excavata) (Najdrová, 2022) – detailněji budou komponenty GET dráhy u tohoto organismu popsány v kapitole 2.3.5.

Mechanismus translokace TA proteinu pomocí GET dráhy lze rozdělit do tří základních kroků – transport proteinu uvolněného z ribozomu přes cytosolický, či tzv. pre-targetovací komplex, transport proteinu pomocí ATPázy k membráně ER a finální inzerce proteinů do membrány ER skrze membránový inzertázový komplex (Borgese et al., 2019).

Po uvolnění C-terminální domény z ribozomu je nascentní TA protein připojen pomocí chaperonu Heat shock protein 70 (**Hsp70**) na chaperon Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat [TPR]-containing protein 2 (**Sgt2**), aby došlo k zabránění kontaktu hydrofobní TMD s vodným prostředím cytosolu (Cho & Shan, 2018; Denic et al., 2013). Sgt2 poté interaguje s Get5 podjednotkou heterotetrameru **Get4/Get5**, čímž dochází k vytvoření tranzientního komplexu Sgt2/Get4/Get5. Get4 podjednotka následně interaguje s homodimerem **Get3**, který funguje jako ATPáza, jež doručí TA protein až k membráně ER. Zde interaguje s inzertázovým komplexem **Get1/Get2**. Get2 zachytí Get3, přiblíží ho k proteinu Get1, kterému je TA protein předán. Get1 pak zajistí finální vložení TA proteinu do membrány ER (Obr. 3) (Borgese et al., 2019; Chartron, Clemons, et al., 2012; Denic, 2012).

V TRC dráze mnohobuněčných organismů figurují ortology proteinů GET dráhy (Tab. 1). Vyskytuje se zde navíc protein Bcl2-associated athanogene co-chaperone (**Bag6**), který je součástí pre-targetovacího komplexu a spolu s ortology proteinů Get4 a Get5 tvoří heterotrimer Get4/Bag6/Get5, který plní stejnou funkci jako jednodušší Get4/Get5 komplex kvasinek (Borgese et al., 2019).



Obr. 3 – Schéma GET a TRC dráhy. Nascentní TA protein je zachycen chaperonem Hsp70, který ho předá chaperonu Sgt2. Poté je TA protein transportován na komplex Get4/Get5 (kvasinkový model), či na komplex Get4/Bag6/Get5 (model u mnohobuněčných organismů). Z tohoto komplexu je TA protein přenesen k proteinu Get3, který ho dopraví ke komplexu Get1/Get2 sídlícímu v membráně ER. Komplex Get1/Get2 má inzertázovou funkci a zaručí vložení TA proteinu do membrány ER. Převzato z (Najdrová, 2022).

Tab. 1 – Komponenty GET dráhy u *S. cerevisiae* a jejich homology v TRC dráze u mnohobuněčných organismů. *S. cerevisiae* nedisponuje ortologem Bag6. Zkratky: **SGTA** – Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat [TPR]-containing protein A; **Bag6** – Bcl2-associated athanogene 6; **Ubl4A** – Ubiquitin-like protein A; **TRC35** – Transmembrane recognition complex of 35 kDa; **TRC40** – Transmembrane recognition complex of 40 kDa; **CAML** – Calcium modulating cyclophylin ligand; **WRB** – Tryptophan-rich basic protein. Převzato z (Najdrová, 2022).

<i>S. cerevisiae</i>	Metazoa
Sgt2	SGTA
-	Bag6
Get5	Ubl4A
Get4	TRC35
Get3	TRC40
Get2	CAML
Get1	WRB

2.3.1.1. Iniciální kroky GET dráhy – Hsp70, Ydj1, Sis1

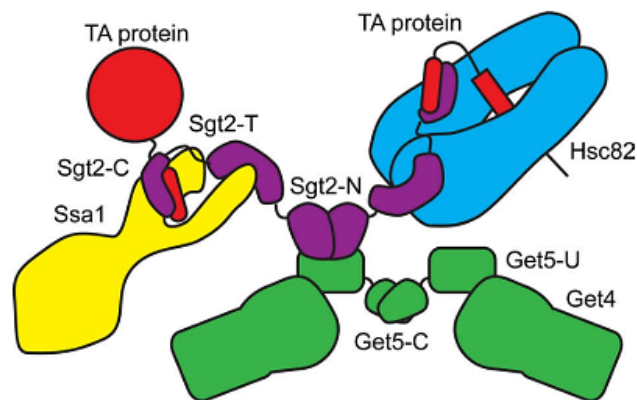
Kritický význam v post-translační translokaci TA proteinů mají chaperony, které je udržují v nesloženém stavu a zabráňují jejich agregaci v cytosolu (Lee et al., 2021).

Původně se předpokládalo, že chaperonem GET dráhy je výlučně protein Sgt2 (Chartron et al., 2011; Chartron, VanderVelde, & Clemons, 2012; Simon et al., 2013). Ukázalo se však, že Sgt2 jako chaperon pro zachycení nascentního TA proteinu není dostatečný a že iniciální zachycení TA proteinu zprostředkovává chaperon **Hsp70**, u kvasinek také nazýván **Ssa1**. Tento chaperon se obecně podílí na správném skládání proteinů a na jejich úspěšném transportu (Tomiczek et al., 2020). U TA proteinů tomu není jinak – Hsp70 se okamžitě přichytí na hydrofobní doménu nově syntetizovaného TA proteinu, čímž brání špatnému složení a zaručuje úspěšné předání TA proteinu k Sgt2 (Borgese et al., 2019; Cho et al., 2024). Činnost Hsp70 v GET dráze je regulována pomocí dvou co-chaperonů – proteinů **Ydj1** a **Sis1** patřících do skupiny tzv. J-domain proteinů (JDP) (Pedrola & Rüdiger, 2021). Jednou z úloh JDP je regulace ATPázového cyklu chaperonů (Liou et al., 2007). Ydj1 a Sis1 zajišťují vazbu TA proteinu do vazebného místa Hsp70 za hydrolýzy ATP. Při experimentální delecí se ukázalo, že Hsp70 je schopný transportu substrátu i bez těchto co-chaperonů, avšak přítomnost JDP výrazně zvyšuje úspěšnost tohoto procesu (Cho et al., 2021). Bez Hsp70 je pak translokace TA proteinu do membrány ER téměř nemožná, což bylo prokázáno inaktivací Hsp70 *in vivo* (Cho & Shan, 2018).

2.3.1.2. Pre-targetovací komplex – Sgt2, Get4, Get5, Bag6

Funkcí chaperonu **Sgt2** je nasměrovat nově nasyntetizovaný TA protein k jeho doručení k membráně ER (F. Wang et al., 2010).

Sgt2 tvoří dimer, který navázaný TA protein odevzdá Get3 ATPáze za pomoci Get4/Get5 heterotetrameru u kvasinek či Get4/Get5/Bag6 heterotrimeru u mnohobuněčných organismů (Darby et al., 2014; K. F. Lin et al., 2021). Sgt2 je tvořen třemi doménami – v místě N-terminální domény dochází k dimerizaci, na základě které má dimer otevřenou konformaci a je přístupný interakcím s dalšími proteiny (Simon et al., 2013). N-terminální doména je také místem interakce s heterotetramerem Get4/Get5. U mnohobuněčných organismů N-terminální doména SGTA interaguje s N-terminální doménou proteinu Bag6 (Chartron, VanderVelde, & Clemons, 2012). Další doménou je tetratricopeptidová (TPR) doména, ve které se nachází vazebné místo pro chaperony a přes tuto doménu je zprostředkován kontakt s Hsp70 s navázaným TA proteinem (Liou & Wang, 2005). Na TPR doménu savčího ortologu SGTA se také mohou vázat receptory pro růstové faktory a proteiny viru HIV (Chartron et al., 2011; Krysztofinska et al., 2017; Philp et al., 2016). Poslední, velmi důležitou doménou je C-terminální doména bohatá na glutamin a methionin, která obsahuje vazebné místo pro hydrofobní substráty zahrnující i TA proteiny (Obr. 4) (Cho et al., 2024; K. F. Lin et al., 2021). Ukázalo se, že N-terminální i C-terminální doména jsou esenciální pro funkci proteinu, na rozdíl od TPR domény, kterou lze postrádat (Kohl et al., 2011). Delece Sgt2 u kvasinek je možná, ale vede k defektům v lokalizaci TA proteinů (Battle et al., 2010).



Obr. 4 – Schéma domén Sgt2 a jejich funkcí v rámci GET dráhy u *S. cerevisiae*. Sgt2-N značí N-terminální doménu proteinu, která zprostředkovává dimerizaci a interakci Sgt2 s ubiquitin-like (UBL) doménou Get5 (Get5-U). Sgt2-T označuje TRP doménu důležitou pro interakci se chaperony přenášejícími TA protein. Sgt2-C pak značí C-terminální doménu, kde se nachází vazebné místo pro TA protein, jehož TMD je chráněna chaperony, jako jsou Ssa1 či Hsc82. Převzato z (Chartron et al., 2011).

Předání TA proteinu z Hsp70 chaperonu vede ke změně konformace Sgt2 z otevřené na zavřenou, čímž je zabráněno ztrátě substrátu a hydrofobní doména substrátu je tak chráněna před agregací ve vodném prostředí cytosolu. Pro ochranu substrátu jsou nutné obě C-terminální domény homodimeru, jinak hrozí uvolnění substrátu z vazebného místa. Je také možné, že Sgt2 funguje jako filtr pro výběr dostatečně hydrofobních TA proteinů pro translokaci přes GET dráhu. Příkladem jsou mitochondriální TA proteiny, jejichž TMD je slabě hydrofobní. Tyto proteiny jsou zřejmě chaperonem Hsp70 transportovány až k membráně mitochondrií bez účasti Sgt2 (Cho et al., 2024; Rao et al., 2016; F. Wang et al., 2010).

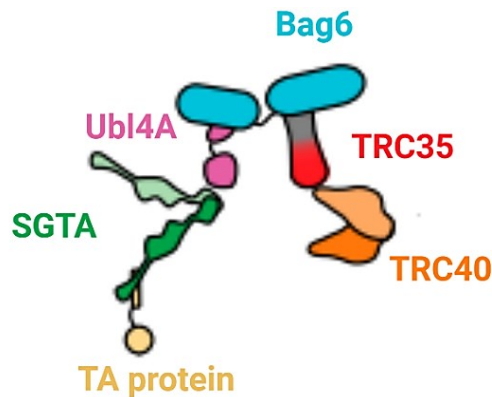
Sgt2 nefunguje pouze jako vstupní bod GET dráhy, ale má značný vliv na udržení homeostáze proteinů, jež je zaručena skrze jeho chaperonovou aktivitu. Nejspíše reguluje ATPázovou aktivitu chaperonu Hsp70 (Angeletti et al., 2002) a podílí se také na retrográdním transportu polyubiquitovaných proteinů přes ER-associated degradation (ERAD) dráhu a jejich degradaci v proteazomu (Y. Xu et al., 2012). Sgt2 také umožňuje správnou lokalizaci integrálních membránových proteinů – brání ubiquitinaci mislokalizovaných proteinů, čímž oddaluje jejich degradaci v proteazomu a zvyšuje pravděpodobnost jejich post-translační translokace (Wunderley et al., 2014). Nedostatečná funkce SGTA u *Homo sapiens* zřejmě hraje roli v rozvoji onemocnění neurodegenerativního charakteru a tento protein je také využíván během infekce polyomavirem pro transport viru z ER do cytosolu (K. F. Lin et al., 2021).

Get4 je evolučně konzervovaný protein, který se nachází u mnohých eukaryotických skupin. Žádný homolog Get4 však dosud nebyl nalezen u bakterií ani zástupců skupiny Archea, stejně jako většina komponent GET dráhy (Chartron et al., 2010; Fernandes et al., 2008). C-konec tohoto proteinu obsahuje několik repetitivních α -helixů, pomocí kterých se váže na N-terminální doménu Get5 za vzniku heterotetrametrického komplexu Get4/Get5 (Chartron, Clemons, et al., 2012; Chartron, VanderVelde, Rao, et al., 2012; Jonikas et al., 2009). Přes N-terminální doménu pak interaguje s ATPázou Get3, čímž zajišťuje předání TA proteinu z komplexu Get4/Get5 na tuto ATPázu (Bozkurt et al., 2010; Gristick et al., 2014). **Get5** byl původně popsán jako protein Mdy2, který má u kvasinek zásadní vliv na jejich párování (Hu et al., 2006). Centrální ubiquitin-like (UBL) doména tohoto proteinu je určena k interakci s Sgt2 proteinem, od kterého přijímá transportovaný TA protein (Battle et al., 2010; Chang et al., 2010; Chartron, VanderVelde, & Clemons, 2012). Zatímco odstranění Get4 i Get5 vede ke zpomalení růstu a snížení velikosti populace kvasinek (Chang et al., 2010; Chartron et al., 2010), u nádorových buněk vyvolávají tyto proteiny opačné fenotypy – u myších modelů vede odstranění Get4 ke zpomalení růstu nádoru, zatímco odstranění či utlumení exprese Get5 vede k rychlejší nádorové progresi (H. Chen et al., 2019; Koike et al., 2022).

Tyto odlišnosti mezi kvasinkovými a lidskými ortology mohou odrážet jejich odlišnou organizaci. **TRC35**, ortolog Get4, neobsahuje na C-konci α -helixy nutné pro interakci s Get5 a **Ubl4A**, ortolog Get5, neobsahuje N-terminální doménu pro interakci s Get4 (Chartron et al., 2010; Mock et al., 2015). Namísto těchto domén je u TRC dráhy interakce TRC35 s Ubl4A v pre-targetovacím komplexu zprostředkována dalším proteinem, Bcl-2 associated athanogene 6 (**Bag6**). Bag6 byl poprvé popsán jako Human Leukocyte Antigen (HLA) - B associated transcripts 3 (Bat3), který je součástí klastru genů na chromozomu šest zahrnujícího geny pro hlavní histokompatibilní komplex (MHC) III. třídy (Banerji et al., 1990; Leznicki et al., 2010).

Bag6 je velký protein (1132 AA) tvořený několika doménami – UBL doménou na N-konci, centrální doménou bohatou na prolin, doménou s jaderným lokalizačním signálem (NLS) a BAG doménou na C-konci (Chartron et al., 2011; Kabbage & Dickman, 2008; Yan et al., 2003). Spolu s proteiny TRC35 a Ubl4A tvoří heterotrimerní komplex (Hessa et al., 2011; Mariappan et al., 2010), avšak s TA proteiny sám fyzicky neinteraguje. Tvoří jakýsi most pro TRC35 a Ubl4A (Obr. 5), se kterými interaguje prostřednictvím jejich C-terminálních

domén. TRC35 se na Bag6 váže v místě NLS, čímž tuto sekvenci maskuje a brání tak jaderné lokalizaci Bag6. Ubl4A se na Bag6 váže v místě BAG domény (Mock et al., 2015).



Obr. 5 – Schéma přenosu TA proteinu pomocí pre-targetovacího komplexu TRC dráhy.

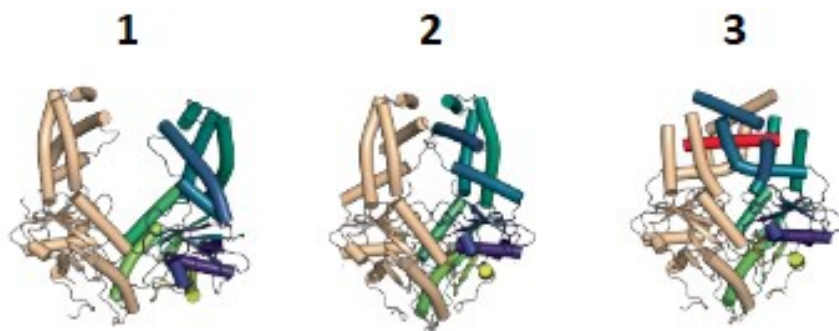
V této dráze lze najít unikátní protein Bag6, který nemá svůj kvasinkový ortolog. Zajímavostí je, že i přes svou zásadní důležitost při přenosu TA proteinů sám Bag6 s TA proteinem fyzicky neinteraguje, neboť působí jako můstek mezi proteiny TRC35 a Ubl4A a zprostředkovává vznik heterotrimeru TRC35/Bag6/Ubl4A. TA protein je z SGTA proteinu přenesen přes Ubl4a a TRC35 až k cytosolické ATPáze TRC40. Na schématu je znázorněn i počet domén jednotlivých proteinů a jejich vzájemné interakce. Převzato a upraveno podle (Mock et al., 2015).

Ještě před objevením role Bag6 v transportu TA proteinů byl tento protein znám pro velké množství dalších funkcí. Jednou z nich je imunoregulace – Bag6 se podílí na aktivaci tzv. natural killer (NK) buněk či reguluje funkci Th1 lymfocytů (Kämper et al., 2012; Mock et al., 2015; Simhadri et al., 2008). Dále se podílí na kontrole kvality proteinů – účastní se degradace špatně sbalených membránových proteinů a zastává výraznou roli v ERAD dráze. Bag6 zde figuruje jako chaperon s tzv. holdázovou aktivitou – pomáhá přenášet proteiny z ERAD dráhy do proteazomů na degradaci, zatímco udržuje jejich solubilitu v cytosolu (Akahane et al., 2013; Mock et al., 2017; Q. Wang et al., 2011; Y. Xu et al., 2012). Role Bag6 v kontrole kvality proteinů se ukazuje jako zásadní pro rozvoj onemocnění, během kterých dochází k akumulaci špatně sbalených proteinů, jako je tomu např. u Parkinsonovy choroby (Minami et al., 2010). Bag6 je také spojován s řadou nádorových onemocnění (Binici & Koch, 2014), což podporuje experimentální odstranění Bag6, které vedlo k zastavení buněčného cyklu (Winnefeld et al., 2006). Další funkcí Bag6 je regulace apoptózy skrze interakci s Reaper proteinem, který je hlavním apoptotickým faktorem u *Drosophila melanogaster* (Krenciute et al., 2013; Thress et al., 2001).

2.3.1.3. Targetovací faktor Get3

ATPáza **Get3** byla prvním objeveným proteinem GET dráhy (Stefanovic & Hegde, 2007). Zaujímá dvě ATP-dependentní konformace – otevřenou apo konformaci bez navázaného ATP a zavřenou konformaci s navázaným ATP. Zavřená konformace je nutná pro zachycení TA proteinu (Obr. 6) (Fry et al., 2022; Gristick et al., 2015; Stefer et al., 2011; Suloway et al., 2009). Get3 je tvořen N-terminální nukleotid-vazebnou doménou a krátkou oblastí tvořenou α -helixem, který umožňuje vazbu TA proteinu a také působí jako „poklop“ bránící zachycení TA proteinu jinými chaperony (Chio et al., 2019). U Get3 je nejčastěji

pozorována tvorba homodimeru, který je stabilizován zinečnatým kationtem vyskytující se mezi dvěma páry konzervovaných cysteinů (Mateja et al., 2009). U homologů ve skupině Archea byla však pozorována i tvorba tetrameru (Suloway et al., 2012).



Obr. 6 – Model konformačních změn targetovacího faktoru Get3. **1** – Get3 v otevřené apo konformaci bez navázaného ATP. **2** – Po navázání ATP dojde ke změně z otevřené apo na zavřenou konformaci, která umožňuje vazbu TA proteinu do vazebného místa mezi podjednotkami dimeru. **3** – Get3 v uzavřené konformaci s navázaným TA proteinem (červeně). Převzato a upraveno podle (Fry et al., 2022).

Get3-ATP interaguje s komplexem Get4/Get5/Sgt2 s navázaným TA proteinem. Při interakci s tímto komplexem, respektive s proteinem Get4, dojde k dočasné inhibici hydrolýzy ATP, následkem čehož Get3 zůstává v uzavřené konformaci a může tak dojít k předání TA proteinu do hydrofobního žlábků Get3. Následná disociace Get3-TA-ATP od pre-targetovacího komplexu vede k hydrolýze ATP a Get3-TA-ADP se přesouvá k membráně ER, kde se nachází inzertázový komplex Get1/Get2. Interakce Get3 s Get2 vede k uvolnění ADP a následná interakce s Get1 zprostředkovává přesun TA proteinu z otevřené konformace Get3 do membrány ER. Na apo Get3 v otevřené konformaci se poté může navázat nové ATP, což vede ke vzniku uzavřené konformace a Get3 poté disociuje od membrány ER a může opět interagovat s pre-targetovacím komplexem (Bozkurt et al., 2009; Favaloro et al., 2010; Gristick et al., 2014; Kubota et al., 2012; Mariappan et al., 2011).

Ukazuje se, že interakce mezi Get4 a Get3 je zásadní pro předání TA proteinu. Get4 svou N-terminální doménou interaguje s oběma monomery Get3 a mezi těmito proteiny lze pozorovat dvě interakční rozhraní – tzv. kotvící rozhraní zaručující kontakt mezi Get4 a Get3 a regulační rozhraní, které inhibuje ATPázovou aktivitu Get3 a brání tak hydrolýze ATP, čímž udržuje Get3 v uzavřené konformaci a umožňuje předání TA proteinu (Gristick et al., 2014). Pro efektivní transport TA proteinů interaguje Get3 dimer vždy se dvojicí komplexu Get4/Get5 (Chang et al., 2012).

Get3 se zdá být klíčovým proteinem GET dráhy. Zatímco jeho delece u kvasinek se projevila nejen nesprávnou lokalizací TA proteinů, u myších modelů je delece TRC40 (=ortolog Get3) neslučitelná se životem (Mukhopadhyay et al., 2006). Kromě transportu TA proteinů má Get3 i jiné funkce – za oxidativního stresu funguje jako na ATP nezávislá chaperon holdáza – chrání TA protein před agregací v solubním prostředí (Powis et al., 2013; Voth et al., 2014). Za zmínku stojí fakt, že bakteriální homolog Get3, ArsA, se nijak nepodílí

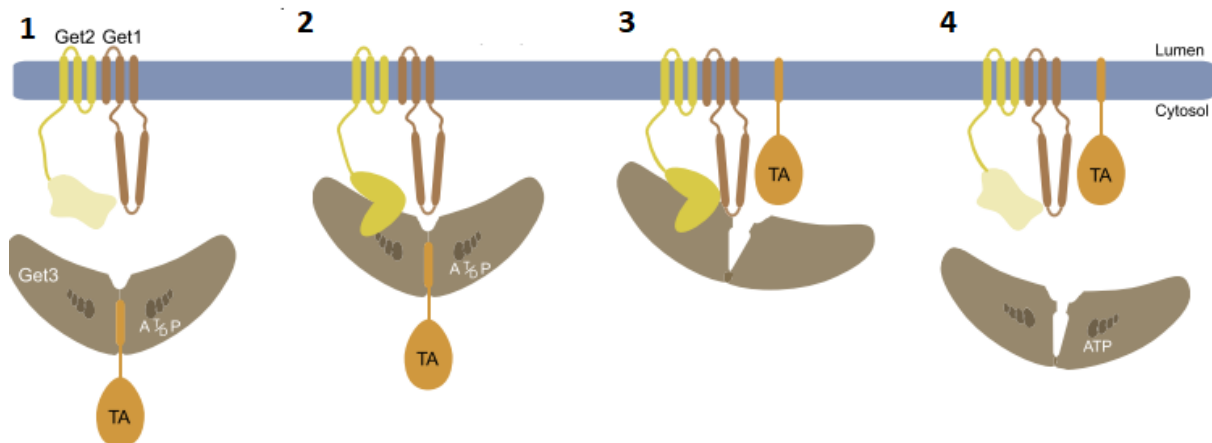
na transportu proteinů, ale zajišťuje rezistenci buňky proti těžkým kovům (C. M. Chen et al., 1986).

2.3.1.4. Inzertázový komplex Get1/Get2

Get3 doručí TA protein k inzertázovému komplexu v membráně ER, který je tvořen proteiny Get1 a Get2 (Jonikas et al., 2009). Tento komplex je vysoce evolučně konzervovaný napříč eukaryoty (Asseck et al., 2021).

Get2 je integrální membránový protein, který je ukotven v membráně pomocí tří TMD. Jeho charakteristickým znakem je cytosolická N-terminální doména, která obsahuje několik pozitivně nabitých aminokyselin. Tato doména funguje jako „raménko“, které zachytí komplex Get3-TA, čímž ho přiblíží k místě vložení TA proteinu. Dlouho se mělo za to, že Get2 slouží pouze k zachycení Get3 a nemá žádný vliv na jeho konformaci (Mariappan et al., 2011; Stefer et al., 2011; F. Wang et al., 2011). Ukazuje se však, že Get2 se společně s Get1 (viz níže) u *S. cerevisiae* podílí i na změně konformace Get3 ze zavřené na otevřenou a ovlivňuje tak samotné uvolnění TA do membrány ER. Děje se tak díky dvěma sekvencím označovaným jako „molecular recognition features“ (MoRF). Při mutaci v těchto sekvencích docházelo k oslabení inserce TA proteinů do membrány ER (Chio et al., 2021). Za zmínku stojí také savčí analog **CAML**. I přesto, že se jedná o protein s totožnou funkcí jako je Get2, nesdílí s Get2 žádnou sekvenční podobnost (Yamamoto & Sakisaka, 2012).

Poté Get3-TA interaguje s proteinem **Get1**. Get1 je, stejně jako Get2, integrální membránový protein tvořený třemi TMD (Mateja & Keenan, 2018). Mezi první a druhou TMD se nachází cytosolická coiled-coil doména, která je nezbytná pro interakci s Get3-TA. Třetí TMD pak zprostředkovává interakci s Get2 (Anghel et al., 2017; McDowell et al., 2020). Coiled-coil doména má strukturu podobnou svorce, která se vmezeří mezi dvě podjednotky Get3, čímž destabilizuje komplex Get3-TA a dojde k narušení hydrofobního žlábků Get3, ve kterém je TA navázán. Zároveň dojde k uvolnění ADP z nukleotid-vazebného místa Get3. Výše zmíněné procesy vedou ke změně konformace Get3 ze zavřené na otevřenou, což umožní uvolnění TA proteinu a jeho následné vložení do membrány. Get3 je uvolněn z komplexu Get1/Get2 v okamžik vazby nové molekuly ATP (Obr. 7) (Mariappan et al., 2011; Stefer et al., 2011).



Obr. 7 – Schéma interakce Get3 s inzerčním komplexem Get1/Get2 při vložení TA proteinu do membrány ER. **1** - Get3 dimer se v uzavřené konformaci s navázaným nukleotidem a TA proteinem přiblíží k membráně ER. **2** - Get2 interaguje s Get3 pomocí cytosolického N-terminálního raménka, čímž přisune Get3 blíže k proteinu Get1. **3** - Get1 pomocí dvou coiled-coil domén rozevřít dimer Get3, čímž narušuje substrát-vazebný hydrofobní žlábek a nukleotid-vazebné místo. Tím dochází k přesmyku z uzavřené konformace Get3 na otevřenou a dojde k uvolnění jak ADP, tak TA proteinu, který je následně vložen do membrány ER. **4** - Vazba nové molekuly ATP na Get3 dimer umožní jeho disociaci od komplexu Get1/Get2. Převzato a upraveno podle (F. Wang et al., 2011).

Ačkoliv spolu Get1 a Get2 tvoří stoichiometrický komplex, struktura tohoto komplexu dosud není plně objasněna (F. Wang et al., 2014). V současné době existují tři možné modely komplexu. První model popisuje existenci Get1/Get2 heterodimeru, přičemž Get3-TA interaguje s jednou kopií Get2 a následně s jednou kopií Get1. Tento model je nejmenší možnou funkční jednotkou pro inzerci TA proteinů (Zalisko et al., 2017). Druhým modelem je heterotetramer. V tomto případě dochází k interakci s oběma podjednotkami Get3 dimeru pomocí dvou kopií Get2 a uvolnění TA proteinu a ADP je zajištěno pomocí cytosolických domén dvou kopií Get1 (McDowell et al., 2020, 2023). Třetí model popisuje existenci dynamického heterotetrameru. K tetramerizaci komplexu Get1/Get2 dochází až v okamžiku přiblížení Get3-TA komplexu (Kubota et al., 2012). Zdá se, že ačkoliv heterodimer Get1/Get2 je dostatečný pro inzerci TA proteinů, existence heterotetrameru zvyšuje efektivitu inzerce (McDowell et al., 2020).

I přesto, že proteiny Get1 a Get2 tvoří evolučně konzervovaný komplex napříč eukaryotickými skupinami, nejedná se o proteiny esenciální (Matsumoto et al., 2022; McDowell et al., 2023). Bylo však prokázáno, že u kvasinek při absenci jednoho z proteinů dochází ke snížení exprese toho druhého (F. Wang et al., 2011). Absence Get1/Get2 komplexu pak vede k cytosolické agregaci Get3 s navázaným TA proteinem. Během stresových podmínek však může být i ztráta Get1 u kvasinek letální (Schuldiner et al., 2008). Absence savčího homologu Get1, **WRB**, může vést k srdečním poruchám či k poruchám zraku a sluchu u člověka i dalších savců (Sojka et al., 2014; Vilardi et al., 2011; Vogl et al., 2016). Při experimentální delecí Get1 v některých případech došlo k defektům v morfogenezi mitochondrií (Dimmer et al., 2002) a odstranění celého komplexu Get1/Get2 velice výrazně snižuje efektivitu mitofágie (Onishi et al., 2018). Odstranění ortologu Get1 u *A. thaliana* vedlo k výraznému zpomalení růstu buněk kořenového vlášení, které rostlinám umožňuje přijímat živiny z půdy (Xing et al., 2017).

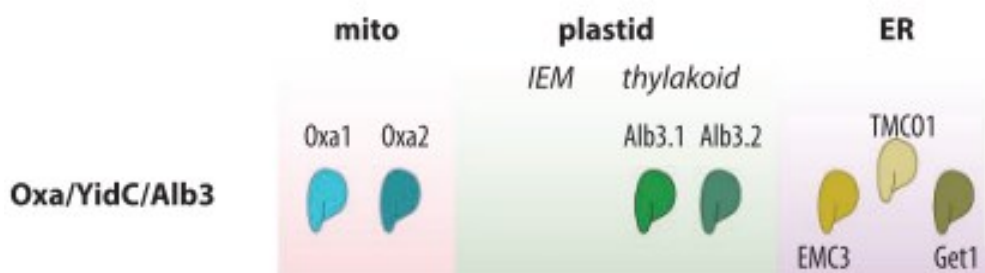
2.3.2. Oxa1 superrodina inzerčů – Get1, EMC3, TMC01

Bioinformatické analýzy ukázaly, že Get1 sdílí topologické a strukturní charakteristiky s proteiny tzv. **Oxa1 superrodiny**. Jádro této superrodiny tvoří proteiny Oxa1, Alb3 a YidC, které zprostředkovávají biogenezi membránových proteinů (Anghel et al., 2017; Hennon et al., 2015).

Proteiny Oxa1, Alb3 a YidC zajišťují inzerci membránových proteinů, jako jsou podjednotky dýchacího řetězce či fotosyntetických komplexů. Mohou fungovat nejen jako inzerčové, ale také jako chaperony (Hennon et al., 2015; P. Wang & Dalbey, 2011). Protein

YidC se nachází v cytoplazmatické membráně bakterií, kde zajišťuje ko- i post-translační vkládání proteinů do membrány. Ve většině případů spolupracuje se Sec translokonom a ribozomem. **Oxa1** se nachází ve vnitřní membráně mitochondrií a spolu s jeho paralogem **Oxa2** umožňuje vkládání membránových proteinů do vnitřní mitochondriální membrány. **Alb3** se nachází v thylakoidní membráně chloroplastů rostlin a zajišťuje post-translační inzerci membránových proteinů (Anghel et al., 2017; Hennon et al., 2015; Petřů et al., 2021).

Při hledání dalších možných homologů patřících do **Oxa1** superrodiny byl nalezen archeální **YidC-like protein 1 (Ylp1)**, který patří do té doby patřil do evolučně konzervované rodiny proteinů o neznámé funkci DUF106 (Borowska et al., 2015). Jako eukaryotické homology **Ylp1** byly posléze identifikovány tři proteiny nacházející se v membráně ER. Jedním z nich je **Get1** a dalšími proteiny jsou **EMC3** a **TMCO1** (Obr. 8) (Anghel et al., 2017). Všechny tyto integrální membránové proteiny mají tři TMD, coiled-coil doménu mezi první a druhou TMD, do cytosolu směřující hydrofilní žlábek pro interakci se substrátem a „N-in, C-out“ topologii (McDowell et al., 2021). Za experimentálních podmínek mohou být tyto homology navíc i částečně funkčně zastupitelné (Anghel et al., 2017; Güngör et al., 2022; P. Wang & Dalbey, 2011).



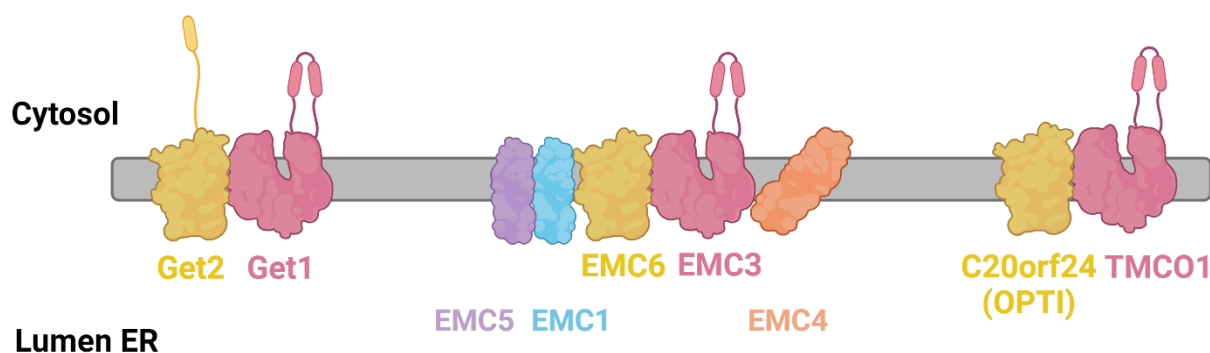
Obr. 8 – Eukaryotické homology prokaryotické inzertázy YidC. Ve vnitřní membráně mitochondrií lze najít **Oxa1** a jeho paralog **Oxa2**, v thylakoidní membráně chloroplastů pak lze najít **Alb3**. Mezi homology **YidC** sídlící v ER pak patří proteiny **EMC3**, **TMCO1** a **Get1**. Převzato a upraveno podle (Petřů et al., 2021).

O **Get1** a jeho interakci s **Get2** bylo pojednáno již v minulé kapitole, a proto bude tato kapitola dále zaměřena zejména na další dva homology, jejich funkci a interakční partnery (Obr. 9).

EMC3 je součástí tzv. ER membrane protein complex (EMC). Úlohou tohoto membránového komplexu je post-translační inzerce TA proteinů a ko-translační inzerce polytopických membránových proteinů do membrány ER. Hlavním interakčním partnerem **EMC3** je podjednotka **EMC6**, homolog proteinu **Get2**. **EMC3/EMC6** komplex je obklopen transmembránovými doménami dalších EMC podjednotek, které zajišťují stabilitu celého komplexu (Bai et al., 2020; McDowell et al., 2021; Pleiner et al., 2020). Mutace v **EMC3** u myši vede k poruchám zraku spojeným se špatným vývojem sítnice (Xiong et al., 2020; X. Zhu et al., 2020). **EMC3** také funguje jako regulátor buněčného cyklu a mutace v genu kódujícím tuto podjednotku mohou vést až k nádorové transformaci buněk (Tang et al., 2023).

Transmembrane and coiled-coil domains 1 (**TMCO1**) je protein, jehož funkce byla dlouhou dobu nejasná i přesto, že se jedná o evolučně konzervovaný eukaryotický protein.

Interakčním partnerem TMC01 je protein C20orf24, také popisován jako „obligate partner of TMC01 insertase“ (OPTI), který je ve skutečnosti, podobně jako EMC6, homologem proteinu Get2 (Sundaram et al., 2022). TMC01 zajišťuje ko-translační inzerci multidoménných membránových proteinů za tvorby velkého komplexu s ribozomem a Sec translokonem. Další významnou funkcí TMC01 je homeostáze vápenatých iontů skladovaných v ER (McGilvray et al., 2020; Q. C. Wang et al., 2016). Mutace v TMC01 může u člověka vést k zelenému zákalu či ke kraniofaciálním deformitám a mentální retardaci (Caglayan et al., 2013; Xin et al., 2010).



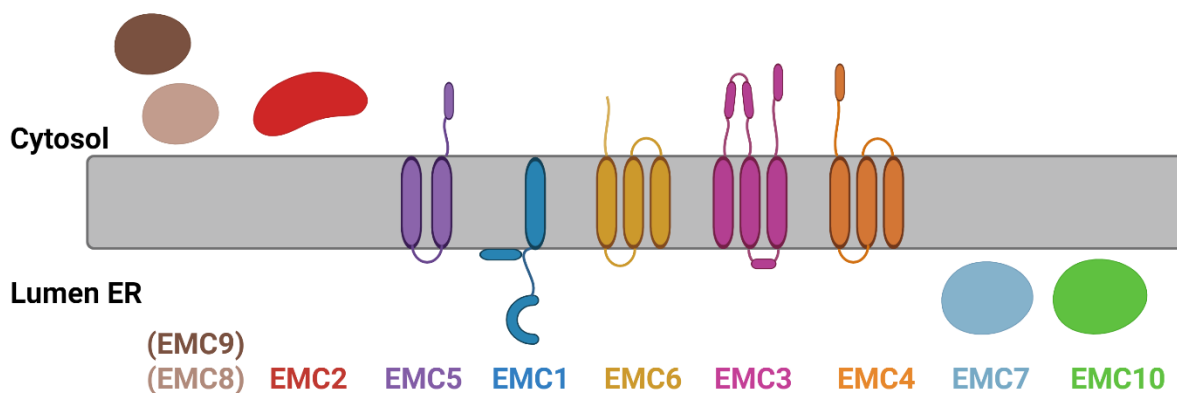
Obr. 9 – Zjednodušené schéma proteinů Oxa1 superrodiny, které i s jejich interakčními partnery sídlí v membráně ER. Get1, EMC3 i TMC01 sdílí stejnou architekturu – u všech zmíněných proteinů lze pozorovat evolučně konzervovanou cytosolickou coiled-coil doménu a hydrofilní žlábek pro kontakt se substrátem. Get1 tvoří komplex s proteinem Get2, EMC3 tvoří komplex s proteinem EMC6 a TMC01 tvoří komplex s proteinem C20orf24 (OPTI). Zmínění interakční partneri proteinů Oxa1 superrodiny jsou taktéž vzájemnými homology. U komplexu Get1/Get2 si lze všimnout cytosolického raménka Get2 pro interakci s Get3, které EMC6 ani C20orf24 nemají. Komplex EMC3/EMC6 pak tvoří spolu s dalšími proteiny EMC dráhy mnohapoljednotkový komplex v membráně pro snazší transport integrálních membránových proteinů. V tomto schématu je názvosloví i složení GET i EMC komplexu uvedeno podle terminologie pro *S. cerevisiae* a TMC01 je popsán podle terminologie pro *H. sapiens* (Hennon et al., 2015; McDowell et al., 2021). Schéma bylo vytvořeno v programu Biorender (<https://www.biorender.com/>) podle (Bai et al., 2020).

2.3.3. EMC komplex

ER membrane protein complex (EMC) je evolučně konzervovaný proteinový komplex, který sahá až k poslednímu společnému eukaryotickému předkovi (LECA) (Wideman, 2015). I přes jeho evoluční stáří nebyla dlouhou dobu známá jeho přesná funkce – podílí se totiž na mnoha buněčných procesech, jako jsou kontrola kvality proteinů, homeostáze lipidů či ERAD dráha pro degradaci proteinů (Christianson et al., 2012; Jonikas et al., 2009; Satoh et al., 2015). Jisté je, že všechny výše zmíněné procesy jsou vázané na buněčné membrány. S membránami a zejména s membránovými proteiny souvisí později objevená hlavní role tohoto komplexu – biogeneze membránových proteinů. EMC komplex zprostředkovává post-translační inzerci TA proteinů se slabě či středně hydrofobními TMD do membrány ER (Chitwood et al., 2018; Guna et al., 2018; Shurtleff et al., 2018). Hydrofobicita TMD TA proteinů tvoří hlavní rozdíl mezi funkcí EMC a GET dráhy – GET dráha transportuje TA proteiny s vysoce hydrofobními TMD (O'Donnell et al., 2020). Další,

neméně podstatnou rolí EMC komplexu je ko-translační vkládání polytopických membránových proteinů. I tento proces má své charakteristiky – EMC obvykle vkládá do membrány ER zejména první TMD lokalizovanou na N-konci proteinu (Chitwood et al., 2018; Miller-Vedam et al., 2020).

Pro studium EMC dráhy se využívají dva hlavní modely – kvasinkový a lidský. Mezi těmito dvěma modely se vyskytují rozdíly v počtu podjednotek – EMC komplex *S. cerevisiae* je tvořen osmi podjednotkami (EMC1-EMC7, EMC10). EMC komplex *H. sapiens* obsahuje ortology kvasinkových podjednotek, a navíc ještě obsahuje buď podjednotku EMC8, nebo EMC9, které jsou vzájemnými homology (Obr. 10). Centrální část komplexu je tvořena podjednotkami EMC1-EMC3, EMC5 a EMC6 a periferní část komplexu tvoří podjednotky EMC4 a EMC7-EMC10 (Bai et al., 2020; O'Donnell et al., 2020; Pleiner et al., 2020).



Obr. 10 – Přehled podjednotek EMC komplexu. Lidský, potažmo savčí, EMC komplex obsahuje navíc ještě buď podjednotku EMC8, či EMC9, které jsou vzájemnými homology. Schéma bylo vytvořeno v programu Biorender (<https://www.biorender.com/>) podle (Bai et al., 2020) a (Q. Zhu et al., 2024).

Strukturu EMC komplexu lze rozdělit na tři hlavní části – transmembránovou, cytosolickou a luminální.

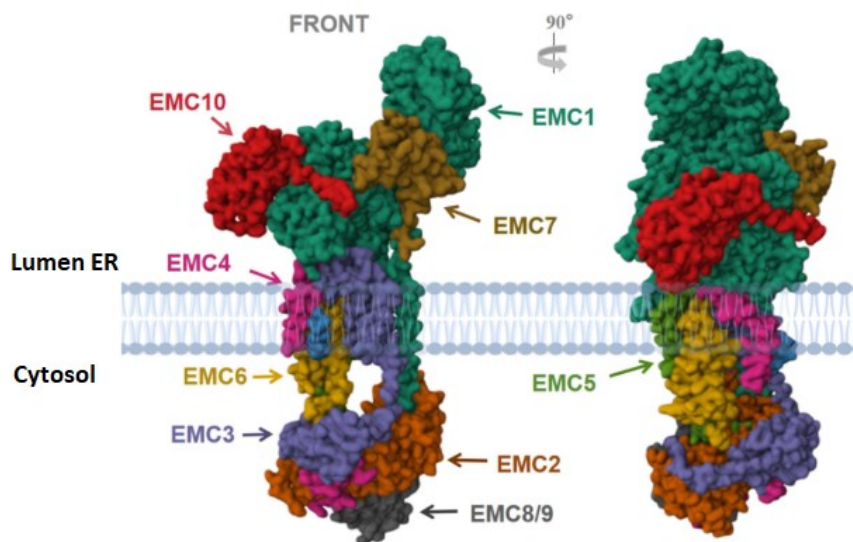
Transmembránová část se nachází v membráně ER, je tvořena TMD podjednotek **EMC1**, **EMC3**, **EMC4**, **EMC5** a **EMC6** a zajišťuje vlastní vložení TA proteinu do membrány ER. Mezi komplexem EMC3/EMC6 je vytvořen hydrofilní žlábek, který zároveň způsobuje ztenčení membrány ER. Obě tyto vlastnosti usnadňují inzerci TA proteinu. Na tvorbě žlábků se podílí také TMD podjednotky EMC4. Domény této podjednotky jsou od komplexu EMC3/EMC6 mírně odvráceny a celá EMC4 podjednotka je mírně mobilní, díky čemuž může docházet k úpravám velikosti žlábků v závislosti na substrátu (Bai et al., 2020; McDowell et al., 2021).

Cytosolická část je u *S. cerevisiae* tvořena solubilní podjednotkou **EMC2**, která interaguje s cytosolickými doménami podjednotek EMC3 až EMC6 za tvorby diskovité domény. Nejvýraznější interakce je s podjednotkou EMC5, pro jejíž C-terminální cytosolickou doménu má EMC2 podjednotka vytvořen speciální žlábek. EMC2 tak zřejmě zajišťuje stabilitu celého komplexu (Volkmar et al., 2019). Je tvořena sedmi TRP doménami a může interagovat i s chaperonem Hsp90 (Kudze et al., 2018). U *H. sapiens*

pak do cytosolické části náleží ještě homology **EMC8** a **EMC9**, které s EMC2 podjednotkou mohou vytvářet EMC2/EMC8 nebo EMC2/EMC9 heterodimer (Miller-Vedam et al., 2020).

Luminální část se nachází v lumen ER a je tvořena podjednotkami **EMC7**, **EMC10** a luminální doménou EMC1, která interaguje s několika EMC podjednotkami a udržuje stabilitu celého komplexu. Ukázalo se, že tato doména a ještě horizontální α -helix umístěný těsně pod membránou sdílí jistou podobnost s doménami bakteriálního proteinu YidC, který byl zmíněn v předchozí kapitole (Bai et al., 2020).

Princip zpracování substrátů EMC komplexem dosud není plně objasněn. Nejedná se o dráhu v pravém smyslu tak, jako je tomu u GET dráhy, ale spíše o velký, stabilní komplex tvořený mnoha vzájemně interagujícími podjednotkami (Obr. 11). Pleiner et al., 2020 však nabízí následující mechanismus vkládání proteinů: nascentní protein je chráněn chaperonem Hsp90, a poté je předán cytosolické podjednotce EMC2. Ta zároveň interaguje s cytosolickými doménami podjednotek EMC3, EMC5 a EMC6 a přiblíží tak nascentní protein k hydrofilnímu žlábků komplexu EMC3/EMC6, který byl dosud zakrytý doménami podjednotek EMC3, EMC4 a EMC7. Po vložení TMD do membrány ER je pak solubilní část substrátu připojena k luminální doméně podjednotky EMC10, která rekrutuje další chaperony.



Obr. 11 – Schéma celistvého EMC komplexu *H. sapiens*. Transmembránová část komplexu je tvořena podjednotkami EMC1, EMC3, EMC4, EMC5 a EMC6. Cytosolická část komplexu je tvořena podjednotkami EMC2, EMC8 a EMC9 a luminální část tvoří podjednotky EMC7 a EMC10. Převzato a upraveno podle (Q. Zhu et al., 2024).

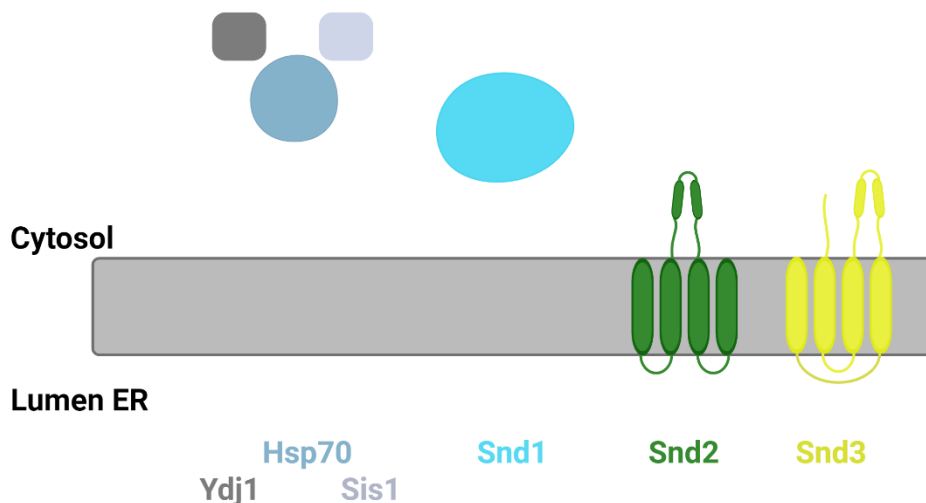
EMC komplex se nachází u mnoha eukaryotických skupin, avšak u některých vzájemně nepříbuzných organismů došlo k jeho kompletní ztrátě. Stalo se tak např. u organismů s redukovanými mitochondriemi, jako jsou *G. intestinalis*, *Blastocystis hominis* či zástupci mikrosporidií (Wideman, 2015).

Jak již bylo zmíněno, EMC komplex zastává v buňce mnoho funkcí. Kromě zmíněné role při kontrole kvality proteinů či v ERAD dráze se EMC komplex podílí také na autofágii (Li et al., 2013) či na zprostředkování kontaktu mezi ER a mitochondriemi (Lahiri et al., 2014). Mutace v podjednotkách EMC1-6 vede ke stresu spojeném s homeostází proteinů v ER

(Bircham et al., 2011). Celý komplex se také chová jako chaperon s holdázovou aktivitou (Z. Chen et al., 2023) a má vliv na buněčnou signalizaci skrze regulaci množství vápenatých iontů v buňce (Kawata et al., 2021; Volkmar et al., 2019). Mutace v podjednotkách EMC1, EMC8 či EMC9 mohou vést k poruchám embryonálního vývoje člověka (Marquez et al., 2023). Podjednotka EMC6 zřejmě hraje roli v tumorigenezi, neboť se ukázalo, že utlumení její exprese inhibuje proliferaci buněk a zpomaluje tím růst nádoru (Zhou et al., 2024). Výraznými fenotypy se projevují mutace v podjednotce EMC10. Přestože její funkce v EMC komplexu nebyla dosud plně objasněna, její mutace vedou k mentální retardaci či k psychiatrickým onemocněním, jako je např. schizofrenie (Diamantopoulou et al., 2017; Umair et al., 2020). Absence EMC10 pak vede k neplodnosti mužů vlivem zhoršené pohyblivosti spermií a nerovnováze iontů ve spermatu (Liu et al., 2022). EMC10 se navíc podílí na angiogenezi a přispívá k regeneraci srdeční tkáně po infarktu (Reboll et al., 2017). V neposlední řadě byl u EMC10 pozorován vliv na obezitu, neboť inhibuje termogenní aktivitu adipocytů a tím napomáhá jejímu rozvoji (X. Wang et al., 2022). Molekulární pozadí těchto různorodých fenotypů však zůstává zcela neznámé.

2.3.4. SND komplex

Dalším způsobem, jak lze transportovat TA proteiny, je tzv. SRP-nezávislá (SND) dráha. Tento nedávno popsany komplex je v buňkách *S. cerevisiae* tvořen třemi proteiny – **Snd1**, **Snd2** a **Snd3** (Obr. 12). SND komplex je schopen transportovat nejen TA proteiny, ale i membránové proteiny, jejichž TMD se nachází zhruba uprostřed sekvence proteinu. SND komplex však může interagovat s SRP částicí a podjednotkami Sec translokonu a je schopný kompenzovat experimentální ztrátu jak SRP, tak GET dráhy a může tedy působit jako zástupný targetovací systém (Aviram et al., 2016; Casson et al., 2017).



Obr. 12 – Komponenty SND dráhy u *S. cerevisiae*. Snd1 je cytosolický protein, který interaguje s ribozomem a spolu s co-chaperony Hsp70, Ydj1 a Sis1 umožňuje přenos substrátu k membránovému komplexu Snd2/Snd3, který obsahuje hydrofilní žlábk pro snazší vložení substrátu do membrány. Oba membránové proteiny mají cytosolickou coiled-coil doménu, nejsou však homologní k proteinu Get1 či jeho ortologům. Schéma bylo vytvořeno v programu Biorender (<https://www.biorender.com/>) podle (Liaci & Förster, 2021).

Protein **Snd1** je cytosolický protein, který pravděpodobně funguje jako targetovací faktor mezi ribozomem a membránovým komplexem Snd2/Snd3 (Aviram et al., 2016). Kontakt substrátu s Snd1 je pravděpodobně zprostředkován pomocí chaperonů Hsp70, Ydj1 a Sis1 (Cho et al., 2021). Proteiny **Snd2** a **Snd3** se nacházejí v membráně ER, kde tvoří heterodimerní komplex. Mezi těmito proteiny se nachází hydrofilní žlábek, který pravděpodobně napomáhá vložení substrátu do membrány ER. Oba proteiny disponují cytosolickou coiled-coil doménou. Je však důležité zmínit, že Snd2 ani Snd3 nejsou nijak homologní s komplexem Get1/Get2 ani s žádnými dalšími proteiny náležícími do Oxal superrodiny. Ukázalo se, že souběžná delece Snd2 a Get3 měla v buňkách letální fenotyp, avšak při deleci pouze jednoho z proteinů došlo pouze k lehké inhibici translokace TA proteinů, což naznačuje vzájemnou zástupnost GET a SND drah u *S. cerevisiae* (Aviram et al., 2016; Liaci & Förster, 2021).

U *H. sapiens* byl dosud nalezen pouze jediný ortolog SND komplexu, a to **hSnd2**. Jedná se o membránový protein, jehož možná funkce tkví v podpoře inserce TA proteinů. hSnd2 také interaguje s podjednotkami Sec translokony. (Haßdenteufel et al., 2017; Lei et al., 2020).

2.3.5. Post-translační translokace u *G. intestinalis*

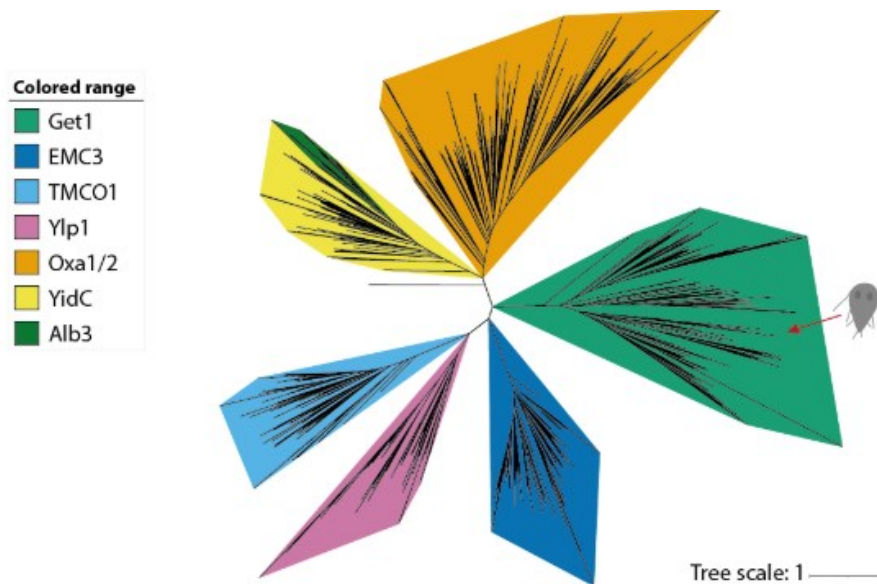
Jedinou dosud identifikovanou drahou pro translokaci TA proteinů u *G. intestinalis* je GET dráha (Najdrová, 2022). Podjednotky EMC komplexu u *G. intestinalis* dosud nebyly nalezeny (Wideman, 2015) a proteiny SND komplexu jsou známy jen u *S. cerevisiae* a *H. sapiens* (Aviram et al., 2016; Haßdenteufel et al., 2017).

Z proteinů GET dráhy byla u *G. intestinalis* doposud experimentálně potvrzena přítomnost následujících proteinů: **Get2** (GL50803_17617), **Get3** (GL50803_7953), **Get4** (GL50803_112893), **Get5** (GL50803_19378), **Bag6** (GL50803_5069), **Sgt2** (GL50803_7287), **Hsp70** (GL50803_88765) a **Ydj1** (GL50803_9808) (Fry et al., 2022; Najdrová et al., nepublikovaná data).

Jako první byl u *G. intestinalis* identifikován protein Get3, jehož míra homologie s Get3 u *S. cerevisiae* i u *H. sapiens* přesahuje 40 %. Při hledání interakčních partnerů Get3 pomocí metody založené na *in vivo* enzymatickém tagování pomocí biotin ligázy (BirA) byly nalezeny komponenty Get2 a Get4. Bioinformatickým přístupem pak byl u *G. intestinalis* nalezen i protein Sgt2, jehož přítomnost byla posléze potvrzena i experimentálně (Fry et al., 2022). Při hledání interakčních partnerů Get4 u *G. intestinalis* byly nalezeny proteiny Get5 a Bag6. Nalezení Bag6 u *G. intestinalis* bylo přelomové, neboť tento protein byl doposud nalezen pouze u mnohobuněčných organismů. Bylo také zjištěno, že Get5 u *G. intestinalis* postrádá N-terminální doménu, která je v kvasinkovém modelu GET dráhy nutná pro interakci s Get4 (viz kap. 2.3.1.2.). Tato topologie Get5 je typická pro savčí model, kde Get5 interaguje s Get4 nepřímo skrze Bag6. Tento model bude pravděpodobně platný pro GET dráhu i u *G. intestinalis*. Při hledání interakčních partnerů Get5 a při bioinformatické charakterizaci pre-targetovacího komplexu byl mezi výše popsány proteiny nalezen i protein **GL50803_5324**. Jedná se o protein neznámé funkce, který je specifický pro *G. intestinalis*. Mohlo by se jednat o specifickou komponentu iniciálních kroků GET dráhy u *G. intestinalis* (Najdrová et al., nepublikovaná data).

Jediným proteinem GET dráhy u *G. intestinalis*, který dosud nebyl experimentálně potvrzen, je Get1. Pomocí bioinformatické analýzy byl v genomu *G. intestinalis* identifikován jeho možný homolog (GL50803_14915, **Get1**) (Fry et al., 2022; Najdrová et al., nepublikovaná data).

Bioinformatické analýzy ukázaly, že identifikovaný protein je zřejmě jediný člen Oxa1 superrodiny přítomný u *G. intestinalis* a ostatní homology EMC3 a TMC01 v membráně ER nejsou přítomny (Obr. 13) (Najdrová et al., nepublikovaná data). *G. intestinalis* navíc postrádá i zástupce SND komplexu (Aviram et al., 2016; Wideman, 2015). Taková situace by znamenala unikátní redukci molekulárních komplexů zodpovědných za vkládání proteinů do membrány ER. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli studovat funkci identifikovaného homologu Get1 v rámci této diplomové práce.



Obr. 13 – Potvrzení výskytu homologu Get1 u *G. intestinalis* pomocí fylogenetické analýzy. Get1 je v současné době jediný nalezený člen Oxa1 superrodiny u *G. intestinalis*. Převzato z (Najdrová et al., nepublikovaná data).

3. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat protein GL50803_14915, který byl bioinformatickou analýzou označený jako homolog Get1 u *G. intestinalis*. Get1 je posledním proteinem GET dráhy u *G. intestinalis*, který nebyl funkčně charakterizován.

Specifické cíle:

- 1) Funkční charakterizace GiGet1 pomocí metody pull-down a charakterizace interakčních partnerů tohoto proteinu.
- 2) Knock-out genu *get1* pro funkční charakterizaci Get1 a následná analýza fenotypu knock-outové linie.
- 3) Navrácení genu *get1* do knock-outové linie a pozorování návratu fenotypu.

4. Materiály a metodika

4.1. Použité organismy a jejich kultivace

4.1.1. *Escherichia coli*

Pro namnožení použitých plazmidů byly použity bakterie *E. coli* kmene TOP10, které byly kultivovány v LB médiu (Bertani, 1951).

4.1.2. *Giardia intestinalis*

Pro pokusy zaznamenané v této práci byl použit kmen *G. intestinalis* WB C6 (ATCC 50803) a jeho odvozené linie. Axenická kultura buněk byla kultivována anaerobně při 37 °C v médiu TYI-S-33 (Tab. 2) (Keister, 1983). Buňky byly sterilně pasážovány každý třetí nebo čtvrtý den, kdy byla kultura buněk plně narostlá, tj. buňky utvořily souvislou vrstvu (monolayer) po stěnách zkumavky. Nejdříve byly mrtvé buňky na dně zkumavky odsáty Pasteurovou pipetou a zkumavka s buněčnou kulturou byla na 10 minut uložena na led, aby došlo k uvolnění trofozoitů z její stěny. Poté bylo Pasteurovou pipetou do nové zkumavky s čerstvým TYI-S-33 s médiem přeneseno 200-300 µl kultury. Pokud nebyly buňky po třech až čtyřech dnech dostatečně narostlé, bylo staré médium pouze nahrazeno médiem čerstvým. Kultury *G. intestinalis* je mimo dobu aktivního používání možné dlouhodobě uchovávat v kapalném dusíku při teplotě -196 °C díky přidání kryoprotektivního 5% dimetylsulfoxidu (DMSO).

Tab. 2 – Složení média TYI-S-33 (pH = 6,8).

Složení	Množství
Difco™ tryptone (Gibco)	20 g/l
Kvasinkový extrakt (Oxoid)	10 g/l
Glukóza (Sigma-Aldrich)	10 g/l
NaCl (Lachner)	5 g/l
K ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 g/l
KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich)	0,6 g/l
L-cystein × H ₂ O (Sigma-Aldrich)	2 g/l
Kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich)	0,2 g/l
Citrát železito-amonný (Sigma-Aldrich)	28 mg/l
Tepelně inaktivované hovězí sérum (Gibco)	10 %

pH média bylo upraveno na 6,8. Následně bylo přidáno tepelně inaktivované hovězí sérum (Gibco) o finální koncentraci 10 %, hovězí žluč o koncentraci 0,1 % a Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) o koncentraci 10 000 U/ml penicilinu a 10 000 µg/ml streptomycinu. Kompletní médium bylo přefiltrováno do sterilních lahví pomocí filtrů Filter Steritop 0,22 µm (Millipore) a skladováno při -20°C.

V případě transfekce byly buňky po elektroporaci plazmidu selektovány příslušnými selekčními antibiotiky (Tab.3).

Tab. 3 – Použitá selekční antibiotika a jejich finální koncentrace.

Selekční antibiotikum	Koncentrace
Puromycin (PUR) (Sigma-Aldrich)	50 µg/ml
Geneticin (G418) (Sigma-Aldrich)	500 µg/ml
Blasticidin (BLAST) (Gold Biotechnology)	75 µg/ml
Ampicilin (AMP) (Sigma-Aldrich)	100 µg/ml

4.1.2.1. Encystace *G. intestinalis*

Pro encystaci trofozoitů bylo využito encystační médium TYE:GS3 připravené podle Uppsala encystačního protokolu (Tab. 4) (Einarsson et al., 2016).

V narostlé kultuře bylo médium TYI-S-33 nahrazeno encystačním médiem TYE:GS3. Kultura byla kultivována 24 hodin v 37 °C a po uplynutí této doby bylo encystační médium opět nahrazeno médiem TYI-S-33. Po další 24hodinové inkubaci v 37 °C byly z kultury s encystovanými buňkami připraveny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii.

Tab. 4 – Složení encystačního média TYE:GS3 (pH = 7,8).

TYE:GS3 základ	Množství
Difco™ tryptone (Gibco)	20 g/l
Kvasinkový extrakt (Oxoid)	10 g/l
Glukóza (Sigma-Aldrich)	10 g/l
NaCl (Lachner)	2 g/l
KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich)	0,6 g/l
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O (Sigma-Aldrich)	1,2 g/l
L-cystein × H ₂ O (Sigma-Aldrich)	2,23 g/l
Kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich)	0,2 g/l
Tepelně inaktivované hovězí sérum (Gibco)	10 %
Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)	10 000 U/ml; 10 000 µg/ml

pH bylo upraveno na hodnotu 7,8 přidáním 3M NaOH. Následně bylo médium sterilizováno filtrací a uchováno při -20 °C. Těsně před zahájením encystace byla do takto připraveného média přidána prášková hovězí a ovčí žluč (Sigma-Aldrich) ve výsledné koncentraci 5 mg/ml a kyselina mléčná (ICN Biomedicals) ve výsledné koncentraci 0,546 mg/ml. Toto kompletní médium bylo poté opět sterilizováno filtrací a ihned použito.

4.2. Použité roztoky a chemikálie

PBS (Phosphate - Buffered Saline) (pH = 7-7,4)

NaCl (Sigma-Aldrich)	137 mM
KCl (Sigma-Aldrich)	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O (Sigma-Aldrich)	10 mM
KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich)	1,8 mM

pH pufru bylo upraveno přidáním 3M NaOH.

SOC médium (Hanahan, 1983)

Trypton (Oxoid)	20 g/l
Kvasinkový extrakt (Oxoid)	5 g/l
NaCl (Sigma-Aldrich)	10 mM
KCl (Sigma-Aldrich)	2,5 mM

Po smíchání všech složek bylo pH upraveno na hodnotu 7 přidáním 3M NaOH (Sigma-Aldrich). Roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C. Po vychladnutí byla do roztoku přidána sterilní glukóza (Sigma-Aldrich) o finální koncentraci 20 mM, sterilní MgCl₂ (Sigma-Aldrich) o finální koncentraci 10 mM a MgSO₄ (Sigma-Aldrich) o finální koncentraci 10 mM.

2× PEM pufr (pH = 6,9)

PIPES (Sigma-Aldrich)	20 mM
EGTA (Sigma-Aldrich)	2 mM
MgSO ₄ (Sigma-Aldrich)	0,2 mM

Během rozpouštění bylo do roztoku po kapkách přidáváno 3M NaOH až do vyčerpání, pH bylo upraveno na hodnotu 6,9 a objem byl destilovanou vodou doplněn na finální hodnotu. Následně byl pufr sterilizován v autoklávu a uchováván při -20 °C.

PEMBALG pufr

PEM	
Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)	1 %
Lysin (Sigma-Aldrich)	100 mM
Želatina z kůže ryb (Sigma-Aldrich)	0,5 %

SM pufr (pH = 7,4)

Sacharóza (Sigma-Aldrich)	250 mM
3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina (MOPS) (Sigma-Aldrich)	20 mM

pH pufru bylo upraveno pomocí 3M NaOH.

1× vzorkový pufr (Laemmli, 1970)

Dodecyl-síran sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)	2 %
Tris (Sigma-Aldrich)	50 mM
Glycerol (Sigma-Aldrich)	10 %

Bromfenolová modř (Serva)	0,002 %
2-merkptoetanol (Sigma-Aldrich)	5 %

Specifické roztoky použité pro imunoblot

Roztok Ponceau S:

Ponceau S (Sigma-Aldrich)	0,5 g/100 ml
Kyselina octová	1 %

Blotovací pufr:

10× Tris-Glycin-SDS (TGS) (BioRad)	100 ml
Methanol (Lach-Ner)	200 ml
dH ₂ O	700 ml

Blokovací pufr:

1× PBS	
Sušené odtučněné mléko (NutriStar)	5 %
Tween 20 (Sigma-Aldrich)	0,2 %

Specifické roztoky použité pro metodu pull-down

5× Boiling pufr (pH = 7,4):

Tris (Sigma-Aldrich)	50 mM
Kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)	1 mM
Deoxycholát sodný (SDC) (Sigma-Aldrich)	1 %

Inkubační pufr (pH = 7,4):

Tris (Sigma-Aldrich)	150 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	50 mM
Triton (Sigma-Aldrich)	1 %

pH obou pufrů bylo upraveno pomocí 1M HCl.

4.2.1. Použité protilátky

4.2.1.1. Imunoblot

Tab. 5 - Použité primární protilátky.

Protilátka	Zvíře	Ředění	Výrobce
α-BAP (monoklonální)	králík	1:1000	GeneScript
α-PDI2 (polyklonální)	krysa	1:2000	Vyrobeno v naší laboratoři
α-Get3 (polyklonální)	krysa	1:2000	Vyrobeno v naší laboratoři
α-Enoláza (polyklonální)	krysa	1:2000	Vyrobeno v naší laboratoři

α -9296 (polyklonální)	králík	1:2000	Vyrobeno v naší laboratoři (Vondráčková, 2012)
α -V5 (monoklonální)	králík	1:1000	Abcam

Tab. 6 - Použité sekundární protilátky.

Protilátka	Ředění	Výrobce
α -králík spojená s křenovou peroxidázou (HRP)	1:2000	Sigma-Aldrich
α -krysa spojená s HRP	1:2000	Sigma-Aldrich

4.2.1.2. Imunofluorescenční mikroskopie

Tab. 7 - Použité primární protilátky.

Protilátka	Zvíře	Ředění	Výrobce
α -BAP (monoklonální)	myš	1:1000	GeneScript
α -V5 (monoklonální)	králík	1:1000	Abcam
α -PDI2 (polyklonální)	krysa	1:1000	Vyrobeno v naší laboratoři
α -Get3 (polyklonální)	krysa	1:1000	Vyrobeno v naší laboratoři
α -VAP (polyklonální)	králík	1:1000	Vyrobeno v naší laboratoři

Tab. 8- Použité sekundární protilátky.

Protilátka	Ředění	Výrobce
α -myš označená Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen
α -králík označená Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen
α -krysa označená Alexa®fluor 488	1:1000	Invitrogen

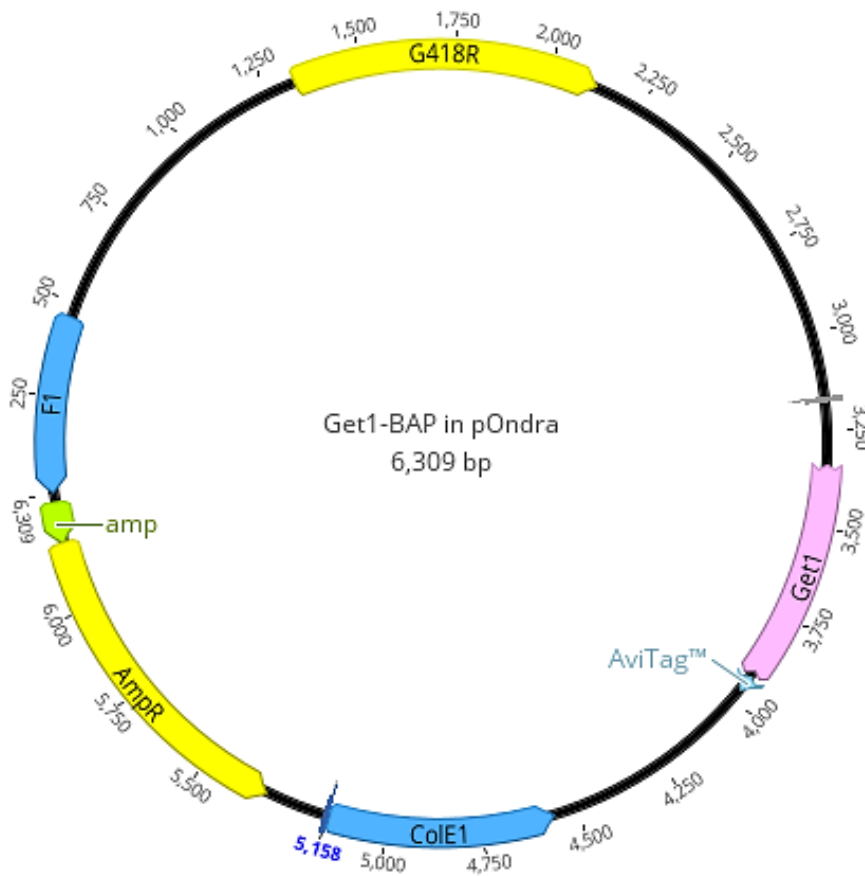
Kromě výše zmíněných protilátek byla při přípravě preparátů encystovaných buněk použita protilátka α -CWP1 od firmy Waterborne. Jedná se o polyklonální primární myší protilátku spojenou se sekundární monoklonální protilátkou označenou fluoroforem Alexa 488, která byla naředěna v poměru 1:500.

4.3. Použité plazmidy

pOndra

Plazmid pOndra, vytvořený v naší laboratoři modifikací plasmidu pRAN-neoGDHluc (Dolezal et al., 2005), byl využit k epizomální expresi genu pro Get1. K sekvenci kódující gen *get1* byl na její C-konec přidán biotin acceptor peptide tag (BAP-tag). Tento tag je klíčový

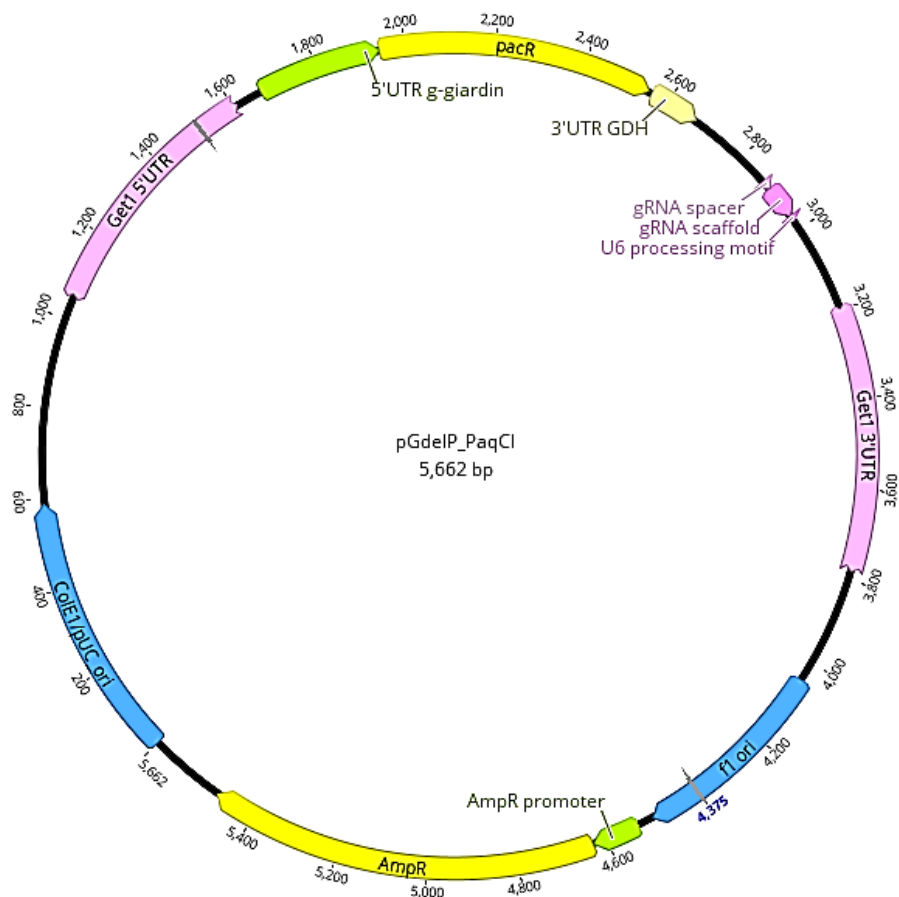
pro biotinylacii proteinu Get1 v pozdějších experimentech. pOndra obsahuje kazety s geny pro ampicilinovou a geneticinovou rezistenci (Obr. 14).



Obr. 14 – Mapa vektoru pOndra se zaklonovaným Get1 s BAP-tagem na C-konci. Modrou barvou jsou znázorněny replikační počátky, žlutá barva značí geny pro rezistenci k ampicilinu a geneticinu, zeleně je pak znázorněn ampicilinový promotor. Světle růžová barva značí gen *get1* a pastelově modrá značí BAP-tag.

pGdelP_PaqCI

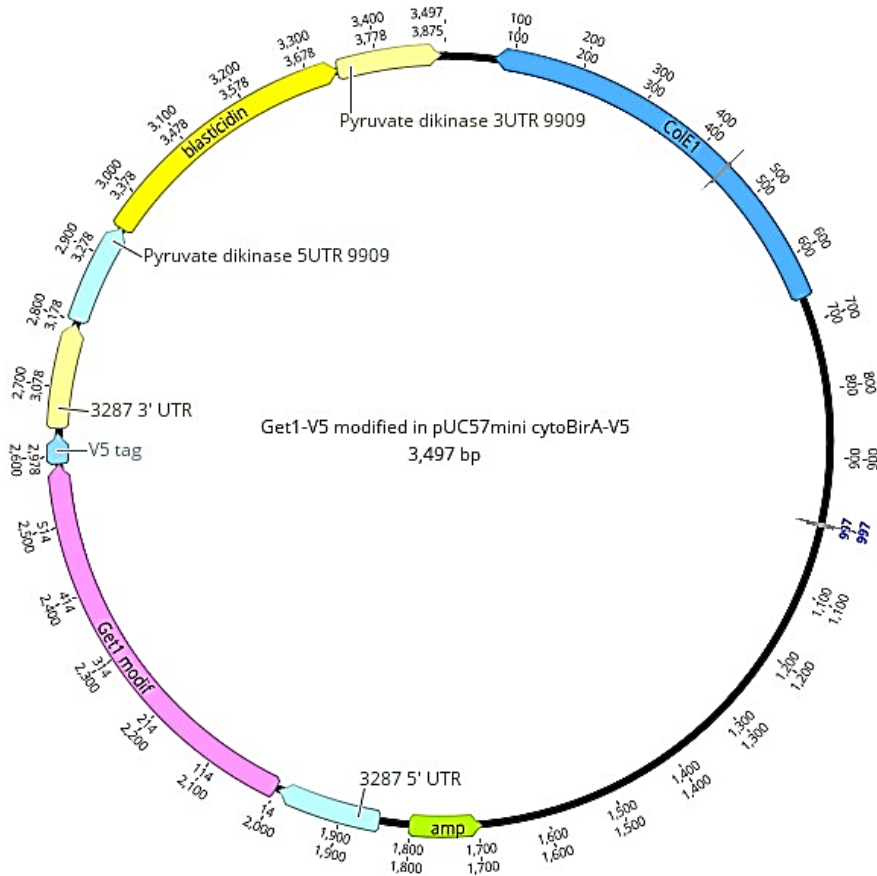
Pro experimenty týkající se genového knock-outu byl v této práci využitý vektor pGdelP_PaqCI, který je modifikací v naší laboratoři dříve vytvořeného plazmidu pTGuide (Horáčková et al., 2022) (Obr. 15). Oproti původnímu plazmidu obsahuje jiná restrikční místa (*PaqCI* namísto *BbsI*), která byla vhodnější pro klonování guide RNA (gRNA) spacerů pro gen *get1*. Plazmid obsahuje deleční kazetu tvořenou dvěma úseky. Vedle této kazety jsou následně zaklonována homologní raménka, která zaručují vložení deleční kazety na chromozom procesem homologní rekombinace. Tato homologní raménka jsou tvořena 5' (=downstream) a 3' (=upstream) homologními oblastmi genu zájmu, v tomto případě genu *get1*.



Obr. 15 – Mapa vektoru pGdelP_PaqCI se zaklonovanými homologními raménky pro *get1*. Modrou barvou jsou znázorněny replikační počátky, žlutá barva značí geny pro rezistenci k ampicilinu a puromycinu, zeleně jsou pak znázorněny promotory pro geny pro antibiotickou rezistenci. Pastelově žlutá barva znázorňuje 3' nepřekládanou oblast (=untranslated region = UTR) genu glutamát dehydrogenázy (GDH), použitou pro terminaci transkripce *pacR* genu. Světle růžová barva zobrazuje homologní raménka tvořená 5' a 3' homologními oblastmi genu *get1* (GL50803_14915), která obklopují celou deleční kazetu. Růžově je také znázorněn úsek deleční kazety, který zaručuje transkripci gRNA. Tento úsek je tvořen již vloženým gRNA scaffoldem, který je nutný pro interakci s Cas9 endonukleázou specifickým gRNA spacerem a UTR spliceosomální U6 RNA.

pUC57-Mini CytoBirA-V5

Vektor pUC57mini CytoBirA-V5 byl využitý pro opětovné „navrácení“ genu *get1* do knock-outové linie buněk *G. intestinalis*. Tento proces je nazýván také jako *add-back* genu či komplementace. Plazmid obsahuje kazetu kódující rezistenci proti blasticidinu (Zemanová, 2019). Výše zmíněný plazmid obsahuje úsek kódující gen pro biotin ligázu (= BirA), který je opatřen V5-tagem a který může být nahrazen sekvencí genu zájmu přes restriční místa BamHI a MluI. Exprese genu je zajištěna promotorem pro acetyl-CoA acetyl transferázu (Obr. 16).



Obr. 16 – Mapa vektoru pUC57Mini se zaklonovaným genem *get1* s pozměněnými bázemi (růžově), opatřeným V5-tagem na C-konci (světle modře). Modře je znázorněn počátek replikace, zeleně je vyznačen ampicilinový promotor, světle modře protomotory pro expresi genu *get1* (5'UTR GL50803_3287 – acetyl-CoA acetyltransferáza) a pro expresi genu blastocidinové rezistence (5' UTR GL50803_9909 – pyruvát dikináza). Gen pro blastocidinovou rezistenci je znázorněn žlutě a světle žlutě jsou znázorněny 3'UTR oblasti obklopující dané geny.

4.4. Základní laboratorní metody

4.4.1. Amplifikace DNA

DNA obsahující *get1* insert byla amplifikována pomocí Q5 polymerázy při PCR za použití forward (Fwd) a reverse (Rev) primerů (Tab.9).

Tab. 9 – Primery pro amplifikaci genu *get1*. Součástí sekvencí primerů jsou barevně vyznačena restrikční místa.

Název	Sekvence 5'→3'
Get1_F_NdeI	CTAGCATATGGCACTCCTCTACCTC
Get1_R_BamHI	CTAGGGATCTGTAAATATAGCAGC

Jako templát byla využita izolovaná genomová DNA (gDNA) *G. intestinalis* z kmene WB C6 (ATCC 50803). Složení reakční směsi a základní program PCR jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11.

Tab. 10 – Složení PCR reakce. Celkový objem činil 50 μ l.

Složení	Množství
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	0,5 μ l
5X Q5 Reaction Buffer (NEB)	10 μ l
Fwd primer (10 μ m)	2,5 μ l
Rev primer (10 μ m)	2,5 μ l
10mM dNTPs (Fermentas)	1 μ l
Templátová gDNA	1 μ l
dH ₂ O	32,5 μ l

Tab. 11 – Základní PCR program pro Q5 polymerázu.

Teplota	Čas	Počet cyklů
98 °C	3 min	1x
98 °C	10 s	35x
50-72°C	30 s	
72 °C	20-30s/kbp	
72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	1x

4.4.2. Izolace DNA z agarózového gelu

PCR produkt byl separován na horizontální gelové elektroforéze v 1% agarózovém gelu. Pro nanesení vzorku byl použit 6x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) a pro následnou vizualizaci na přístroji UV Transiluminator (Syngene) bylo do připravovaného gelu přidáno barvivo SYBR Safe (Invitrogen). Jako standard byl použit GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) a následně byl PCR produkt vyizolován z gelu pomocí kitu E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek).

4.4.3. Klonování

4.4.3.1. Restrikční reakce

Amplifikované DNA úseky byly naštěpeny restrikčními enzymy specifickými pro daný insert. Pufr použitý během restrikce byl vybrán podle použité dvojice restrikčních enzymů (Tab. 12, Tab. 13). Použitý objem vektoru pro každou reakci byl vypočítán tak, aby ve výsledku reakce obsahovala 10 μ g DNA a celá reakce byla následně inkubována v termobloku (3,5 hodiny, 37 °C). Produkty restrikce byly poté separovány horizontální gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu a vyizolovány za použití kitu E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek).

Tab. 12 – Obecné schéma složení restrikčních reakcí. Celkový objem jedné reakce činil 50 μ l.

Vektor		Insert	
Složení	Množství	Složení	Množství
Pufř (NEB)	5 μ l	Pufř (NEB)	5 μ l
Enzym 1 (NEB)	1 μ l	Enzym 1 (NEB)	1 μ l
Enzym 2 (NEB)	1 μ l	Enzym 2 (NEB)	1 μ l
Plazmidová DNA	10 μ g	PCR produkt	30 μ l
dH ₂ O	Doplněna do 50 μ l	dH ₂ O	Doplněna do 50 μ l

Tab. 13 – Popis konkrétních restrikčních reakcí spolu s použitými restrikčními enzymy a pufry. Všechny použité enzymy i pufry jsou od výrobce New England Biolab (NEB).

Restrikční reakce	Použité enzymy	Použitý pufř
PCR produkt Get1 a plazmid pOndra	NdeI, BamHI	r3.1
5'UTR oblast Get1	MluI, SpeI	r3.1
3'UTR oblast Get1	ClaI, PacI	r3.1
CRISPR/Cas9 rezistentní konstrukt	BamHI, MluI	r3.1

4.4.3.2. Ligační reakce

Produkty restrikce byly opatřeny lepivými konci zajišťujícími správné zaligování insertu do vektoru pomocí T4 DNA ligázy (Tab. 14) Objem přidaného vektoru byl vypočítán tak, aby jeho množství v reakci činilo 200 ng. Množství insertu pro danou reakci bylo vypočítáno pomocí ligační kalkulačky (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) v molárním poměru 1:5. Ligační směs poté byla přes noc inkubována v 16 °C.

Tab. 14 – Obecné schéma složení ligační reakce. Celkový objem činil 20 μ l.

Složení	Množství
Vektor	200 ng
Insert	x μ l
T4 DNA ligáza (Thermo Scientific)	1 μ l
10x T4 DNA ligázový pufř (Thermo Scientific)	2 μ l
dH ₂ O	Doplněna do 20 μ l

4.4.4. Transformace kompetentních bakterií *E. coli*

K namnožení vytvořených plazmidů byly použity bakterie *E. coli* kmene TOP10. K 150 μ l alikvótu bakteriální kultury bylo přidáno 500-1000 μ g plazmidové DNA. Nejprve

byla tato směs inkubována 20 minut na ledu, a poté podrobena teplotnímu šoku (30 s, 42 °C). Následovala 2minutová inkubace na ledu, načež bylo přidáno 250 µl SOC média a kultura byla hodinu inkubována na třepačce (220 rpm) při teplotě 37 °C. 150 µl bakteriální kultury bylo rozetřeno na LB agarovou plotnu se selekční antibiotikem, ampicilinem, ve finální koncentraci 100 µg/ml. Plotny byly pak inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

4.4.5. Ověření pozitivních klonů po transformaci

Pro ověření pozitivivity klonů byla provedena PCR reakce přímo na odebraných buňkách z kolonií. Z plotny byla špičkou odebrána narostlá kolonie a následně byla resuspendována ve 20 µl dH₂O. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 9 µl do 0,2ml zkumavky, která byla v cycleru opakovaně podrobena zvyšování a snižování teploty (= crack, Tab. 15).

Tab. 15 – Základní program tzv. crack.

Teplota	Čas
94 °C	3 min
50 °C	3 min
94 °C	3 min
45 °C	3 min
94 °C	3 min
4 °C	∞

Po dokončení výše zmíněného cyklu byla provedena PCR reakce (Tab 16, 17). Jako templátová DNA byla využita DNA uvolněná z bakterií během opakovaného zahřívání.

Tab. 16 – Obecné schéma složení PCR reakce. Celkový objem činil 20 µl.

Složení	Množství
EmeraldAmp MAX HS PCR Master MIX (2X Premix) (TaKaRa)	10 µl
Fwd primer	0,5 µl
Rev primer	0,5 ul
Templátová DNA (lyzát buněk z předchozího kroku)	9 µl

Tab. 17 - Základní program Emerald PCR.

Teplota	Čas	Počet cyklů
98 °C	3 min	1x
98 °C	10 s	30x
60 °C	30 s	
72 °C	60 s / 1 kbp	

72 °C	10 min	1x
4 °C	∞	1x

Výsledný PCR produkt byl poté analyzován pomocí horizontální gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Pozitivní klony byly namnoženy v 5 ml LB média spolu se selekčním antibiotikem, ampicilinem, ve finální koncentraci 100 µg/ml. Plazmidová DNA byla vyizolována za použití kitu E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek). Koncentrace DNA pak byla kvantifikována na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.4.6. Transfekce buněk *G. intestinalis*

Kultura trofozoitů byla napěstována v 50ml kultivačních lahvích až do vytvoření buněčného monolayeru. Poté bylo z lahví vylito médium a lahve byly naplněny ledově vychlazeným, sterilním PBS. Pro uvolnění buněk ze stěn byly kultury inkubovány 20 minut na ledu. Následně byla kultura buněk centrifugována (1200 x g, 10 minut, 4 °C) a vzniklý pelet byl resuspendován v 500 µl média TYI-S-33. Koncentrace buněk v suspenzi byla zjištěna pomocí přístroje Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter) a vzorek byl naředěn na koncentraci $3,3 \times 10^7$ buněk/ml. Do dvou 4mm elektroporačních kyvet bylo přeneseno 300 µl suspenze buněk, do které byla následně přidána plazmidová DNA. Následovala 10minutová inkubace na ledu.

Elektroporace byla provedena v přístroji GenePulser Xcell™ (BioRad) podle exponenciálního protokolu: 350 V, 1000 µF, 750 Ω. Tímto intenzivním elektrickým pulzem došlo k vytvoření pórů v buněčné membráně, kterými se do buněk dostala plazmidová DNA. Poté byly kyvety inkubovány 5 minut na ledu, načež byl celý obsah kyvet přenesen do 16 ml média TYI-S-33. Po 24 hodinách bylo médium nahrazeno čerstvým médiem s přidáním selekčních antibiotiky – PUR (25 µg/ml; poloviční koncentrace) a/nebo G418 (600 µg/ml; plná koncentrace) a/nebo BLAST (75 µg/ml; plná koncentrace). Výměna média za médium s již finální koncentrací selekčních antibiotik probíhala každý třetí den až do doby, kdy buňky poprvé vytvořily monolayer. Poté byla kultura pasážována do 8ml zkumavky a kultivována tak, jak je popsáno v kapitole 4.1.2.

4.4.7. Potvrzení exprese v transfekovaných buňkách *G. intestinalis*

Pro potvrzení exprese epizomálně exprimovaných proteinů z transfekovaných buněk byl po dokončení selekce vytvořen buněčný lyzát. Kultura byla 15 minut inkubována na ledu, a poté centrifugována (1200 × g, 10 minut, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 50–100 µl vzorkového pufru a uchován buď při -20 °C, či ihned použit pro SDS-PAGE a imunoblot.

4.4.8. Izolace gDNA

Z 8 ml narostlé kultury byla vyizolována gDNA pomocí E.Z.N.A. Tissue DNA kitu a protokolu „DNA Extraction and Purification from Cultured cells“. Takto izolovaná gDNA byla použita pro otestování integrace konstruktů a genu *get1* v genomu prostřednictvím PCR.

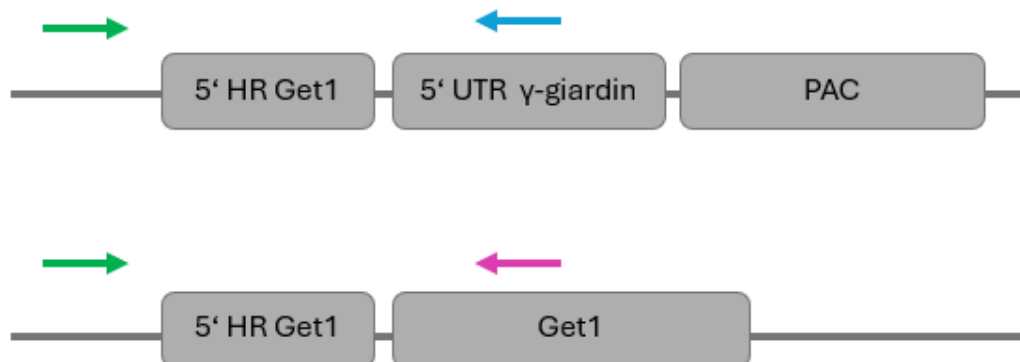
Dvojice primerů pro detekci integrace konstruktů zahrnovala Fwd primer „Get1_gene + insert_check F“, který by se měl vázat do upstream oblasti od genu *get1* před 5′

HR, která je přítomna na plazmidu pGdelP_PaqCI. Rev primer by pak měl být komplementární k sekvenci na již zmíněném plazmidu. Jako Rev primer byl využit již navržený primer „pTGuide_int_R“ nacházející se v 5'UTR oblasti sekvence genu pro puromycin-N-acetyltransferázu (PAC) (Horáčková et al., 2022).

Pro ověření přítomnosti genu *get1* byl použit stejný F primer jako pro ověření integrace konstruktů. Rev primer „Get1_gene_check R“ byl komplementární k sekvenci genu *get1* (Tab. 18, Obr. 17). Složení PCR reakce je uvedeno v tabulce 19, přičemž jednotlivé kroky odpovídají krokům pro Emerald PCR zmíněným v kapitole 4.4.5.

Tab. 18 – Seznam použitých primerů pro ověření integrace konstruktů a přítomnosti genu.

Název primeru	Složení
Get1_gene + insert_check F	CATTTTCAAACACTCAAACACTGCTTC
pTGuide_int_R	AACAGGTCAGACATACGC
Get1_gene_check R	GAGGATAACAGCGCTAA



Obr. 17 – Schéma nasedání primerů pro ověření integrace konstruktů do genomu a přítomnosti genu *get1*. Zelená šipka znázorňuje primer „Get1_gene + insert_check F“, který je společný pro ověření integrace konstruktů i přítomnosti genu. Modrá šipka označuje primer „pTGuide_int_R“, který je komplementární k sekvenci genomu *G. intestinalis* v plazmidu a růžová šipka označuje primer „Get1_gene_check R“, který je komplementární k sekvenci genu *get1*.

Tab. 19 – Obecné schéma složení PCR reakční směsi. Celkový objem činil 20 µl.

Složení	Množství
Templátová gDNA	1 µl
EmeraldAmp MAX HS PCR Master MIX (2x Premix) (TaKaRa)	10 µl
Fwd primer	0,5 µl
Rev primer	0,5 µl
dH ₂ O	8 µl

4.4.9. Stanovení koncentrace proteinů

Pro změření koncentrace jednotlivých vzorků bylo nutné vytvořit kalibrační křivku proteinového standardu, podle které byla vytvořena rovnice pro vypočítání koncentrace proteinů ve vzorku. Jako proteinový standard bylo použito BSA v koncentraci 1 mg/ml, které bylo naředěno dH₂O (Tab. 20). Vzorky jednotlivých frakcí byly připraveny obdobným způsobem, přičemž ve směsi vzorku a dH₂O o objemu 800 μl se nacházely 2 μl vzorku. Do kyvet s naředěnými vzorky bylo následně přidáno 200 μl reagentu (BioRad), jednotlivé směsi byly promíchány a ponechány 20 minut odstát. Poté byla na spektrofotometru Ultrospec 10 (Biochrom) změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 595 nm. Ze zjištěných koncentrací byla pak vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

Tab. 20 - Ředění roztoku BSA pro vytvoření kalibrační křivky.

V (μl)	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
BSA	0	2,5	5	10	15	20
dH ₂ O	800	797,5	795	790	785	780

4.4.10. SDS-polyakrylamid gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům a denaturovány inkubací v 95 °C po dobu 10 minut. Po přípravě vzorků byl sestaven aparát pro vertikální SDS-PAGE a byly připraveny gely pro separaci proteinů – 12% rozdělovací a 5% zaostřovací polyakrylamidový gel. Jako elektroforetický pufr byl využit Tris-Glycin-SDS (TGS) pufr (BioRad). Jako standard pro určení molekulové hmotnosti proteinů ve zkoumaných vzorcích byl použit PageRulerPlus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Proteiny byly separovány nejdříve při konstantním napětí 100 V a poté, co vzorky zajely do rozdělovacího gelu, bylo napětí zvýšeno na 180 V.

4.4.11. Imunoblot

Gel se separovanými proteiny byl spolu s filtračními papíry a nitrocelulosovou membránou inkubován 10 minut v blotovacím pufru. Poté byly jednotlivé komponenty vyskládány spolu na anodu kazety Trans-Blot Turbo (BioRad) v následujícím pořadí: zachytávač iontů, filtrační papír, nitrocelulosová membrána, gel se separovanými proteiny, filtrační papír, zachytávač iontů. Proteiny byly migrovány z gelu na membránu 7 minut za konstantního proudu 1,3 A a napětí 25 V.

Kontrola přenesených proteinů byla provedena pomocí roztoku Ponceau S (Sigma-Aldrich). Po tomto kroku byla membrána blokována v blokovacím pufru (1 hodina, pokojová teplota = PT) a následně inkubována v primární protilátce v blokovacím pufru (přes noc, 4 °C). Druhý den byla membrána promyta v blokovacím pufru 3 × 15 minut a inkubována se sekundární protilátkou v blokovacím pufru (1 hodina, PT). Následovalo opět trojnásobné promytí, poslední promytí však bylo provedeno pouze PBS. Vizualizace byla provedena chemiluminiscenčním substrátem pro křenuvou peroxidázu (HRP) (Invitrogen) v přístroji Amersham Imager 6000 (GE Life Sciences).

4.4.12. Imunofluorescenční mikroskopie

4.4.12.1. Metanol-acetonová fixace buněk trofozoitů

Narostlá kultura, ve které trofozoiti vytvořili plný monolayer po stěnách zkumavky, byla umístěna na 15 minut na led pro snazší uvolnění trofozoitů ze stěn zkumavky. Uvolněné buňky byly centrifugovány ($1000 \times g$, 10 minut, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a pelet buněk byl resuspendován v 1,5 ml média TYI-S-33. Resuspendovaný pelet byl uložen na led a pro tvorbu preparátů byla vytvořena komůrka – mezi dvě podložní sklička byla vložena silikonová destička s vyříznutým obdélníkem, který vytvořil prostor pro přenos buněk na skličko. Takto vytvořený „sendvič“ byl upevněn pomocí kancelářských klipsů. Resuspendované buňky byly pomocí injekční stříkačky přeneseny do komůrky a umístěny do 37°C . Po 10 minutách byl systém sklíček otočen na druhou stranu a inkubován dalších 15 minut, aby se buňky snáze přichytily na povrch podložního skla.

Po dokončení inkubace byla sklička vyjmuta ze „sendviče“ a ponechána lehce zaschnout, načež byla sklička s buňkami fixována 5 minut ve vychlazeném metanolu ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Následně byly buňky permeabilizovány 5 minut ve vychlazeném acetonu ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Aby bylo zabráněno vyschnutí preparátů s permeabilizovanými buňkami, byla podložní sklička uložena do vlhké komůrky.

4.4.12.2. Fluorescenční značení

Preparáty byly blokovány PEMBALG pufrem 30 minut v PT. Následně byly buňky 3×10 minut promývány PEM pufrem. Poté byly buňky přes noc inkubovány s primární protilátkou naředěnou v pufru PEMBALG. Druhý den byly preparáty 3×15 minut promyty PEM pufrem. Následně byly buňky inkubovány se sekundární protilátkou naředěnou v pufru PEMBALG. Od této chvíle byly všechny následující kroky prováděny za minimálního přístupu světla. Na závěr byla sklička zamontována pomocí montovacího média Vectashield obsahujícího DAPI (Vector Laboratories). Krycí sklička byla připevněna k podložním sklíčkům lakem na nehty.

4.4.12.3. Formaldehydová fixace encystovaných buněk

Ke kultuře encystovaných buněk byl přidán formaldehyd (Electron Microscopy Sciences) o finální koncentraci 1 % a následovala 30minutová inkubace ve $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Posléze byla směs centrifugována ($900 \times g$, 5 minut, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) a promyta v 1 ml PEM pufru ($900 \times g$, 5 minut, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Po odebrání supernatantu byl pelet resuspendován v příslušném objemu PEM pufru, tj. 150 μl pufru na jedno skličko.

100 μl resuspendovaného peletu bylo nanášeno na krycí skla pokrytá poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich). Skla byla ponechána 15 minut při PT pro uchycení buněk na povrch a byla dosušena proudem vzduchu. Buňky byly permeabilizovány 10 minut v 0,1% Tritonu (Sigma-Aldrich) v PEM pufru, jenž byl následně odmyt 3×10 minut PEM pufrem.

4.4.12.4. Fluorescenční značení

Preparáty byly blokovány v pufru PEMBALG po dobu 30 minut v PT. Po odsátí blokovacího pufru byly preparáty inkubovány s primární protilátkou α -CWP1 již spojenou

se sekundární protilátkou a fluoroforem Alexa 488 po dobu jedné hodiny bez přístupu světla. Po inkubaci byly buňky pomyty PEM pufrům (3×10 minut). Takto připravená krycí sklíčka byla zamontována na sklíčka podložní za použití montážního média Vectashield obsahujícího DAPI (Vector Laboratories) a připevněna byla pomocí laku na nehty.

4.4.13. Fluorescenční mikroskopie a zpracování fotografií

Mikroskopie byla provedena v Servisní laboratoři zobrazovací techniky (IMCF) v BIOCEVu. Preparáty s trofozoity byly pozorovány za použití olejového objektivu se zvětšením 62x na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Leica TSC SP8 WII SMD-FLIM. Preparáty s encystovanými buňkami byly pozorovány na invertovaném konfokálním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-S za použití olejového objektivu se zvětšením 100x.

Dekonvoluce u snímků pořízených na invertovaném konfokálním mikroskopu byla provedena v programu Huygens Professional verze 19.10 (Scientific Volume Imaging). Fotografie pořízené na obou mikroskopech byly dále upravovány v programu ImageJ verze 1.53J (Schindelin et al., 2012).

4.5. Laboratorní metody specificky využívané pro charakterizaci Get1

4.5.1. Overexprese Get1-BAP

4.5.1.1. Frakcionace buněk *G. intestinalis*

V kultivační lahvi o objemu 250 ml s plně narostlou kulturou buněk bylo médium buněk vyměněno za ledově vychlazené, sterilní PBS a uvolněné buňky byly centrifugovány (1200 × g, 10 minut, 4 °C). Pelet byl promyt v 7 ml SM pufru (1200 × g, 10 minut, 4 °C) a vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml SM pufru s přidáním inhibitory proteáz – N- α -tosyl-L-lysin-chlormetylketonem (TLCK) o koncentraci 50 μ g/ml a leupeptinem (LEU) o koncentraci 10 μ g/ml. Vzniklá buněčná suspenze byla homogenizována sonikátorem Q125 (QSonica) při 40% amplitudě s 1sekundovými pulzy v 15sekundových intervalech, dokud nebylo rozbito přibližně 99 % buněk. Ze vzniklého homogenátu bylo odebráno 100 μ l vzorku, označeného jako **lyzát**, pro následnou analýzu.

Vzniklý homogenát byl centrifugován (2680 × g, 20 minut, 4 °C), aby došlo k sedimentaci jader a cytoskeletu. Vzniklý supernatant byl centrifugován na ultracentrifuze Optima XE (Beckman Coulter) (180 000 × g, 30 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odebrán veškerý supernatant, který byl označen jako **cytosol**. Vzniklý pelet byl dodatečně promyt v 300 μ l SM pufru s přidáním inhibitory proteáz a opět centrifugován (180 000 × g, 30 minut, 4 °C). Finální pelet byl resuspendován v 300 μ l SM pufru s přidáním inhibitory proteáz a označen jako high-speed pellet (**HSP**). HSP obsahuje kromě jiných organel zejména endoplazmatické retikulum, které je klíčové pro tuto práci.

V jednotlivých frakcích byla stanovena koncentrace proteinů (viz kap. 4.4.9.) a přítomnost proteinu v daných frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE a imunoblodu.

4.5.1.2. DSP cross-linking

Pro testování dithio(sukcinimidyl)propionát (DSP) cross-linkeru (Thermo Fisher Scientific) bylo použito 50 ml buněčné kultury, která byla promyta v PBS

(1200 × g, 10 minut, 4 °C), v 7 ml SM pufru (1200 × g, 10 minut, 4 °C) a vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml SM pufru s přidanými inhibitory proteáz cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) v koncentraci doporučené výrobcem. Poté byla buněčná suspenze homogenizována za použití sonikátoru (40% amplituda, 30× 1s pulzů). Homogenát byl centrifugován (2680 × g, 20 minut, 4 °C) a vzniklý supernatant byl následně analyzován pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku (viz kapitola 4.4.9.). Vzorky byly poté naředěny sterilním PBS do finální koncentrace proteinů 1,5 mg/ml.

Protože nebyla známa optimální koncentrace DSP pro cross-linking proteinů v daném vzorku, byl vzorek inkubován hodinu na ledu s šesti různými koncentracemi DSP rozpuštěném v DMSO. Chemický cross-linking byl zastaven přidáním 50mM roztoku Tris (pH = 8) a následovala 15minutová inkubace v PT. Poté byl ke všem vzorkům přidán 5× vzorkový pufr bez 2-merkaptetanolu, aby nedošlo k narušení S-S vazeb uvnitř cross-linkeru a vzorky byly inkubovány v 95 °C po dobu 5 minut.

Byly také připraveny dvě negativní kontroly, které obsahovaly pouze DMSO bez přidaného DSP. Jedna z kontrol byla smíchána se vzorkovým pufrem s 2-merkaptetanolem, druhá se vzorkovým pufrem bez 2-merkaptetanolu.

Vzorky byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotu.

4.5.1.3. Afinitní purifikace proteinů – pull-down experiment

Kultura buněk byla napěstována do objemu 750 ml. 24 hodin před sklizením buněk byl ke kultuře přidán biotin v koncentraci 100 mM, který byl biotin ligázou produkovanou z plazmidu pTG BirA navázán na protein zájmu s BAP-tagem.

Z kultivačních lahví s plně narostlou kulturou buněk bylo slito médium a lahve byly naplněny ledově vychlazeným, sterilním PBS. Takto připravené lahve byly uloženy na led a ponechány nejprve 10 minut při 4 °C, dále pak dodatečných 5 minut při -20 °C, aby došlo k uvolnění trofozoitů ze stěn. Kultura buněk byla centrifugována na velkoobjemové centrifuze Avanti J-26 XPI (Beckman Coulter) (1200 × g, 10 minut, 4 °C) a poté na stolní centrifuze (1200 × g, 10 minut, 4 °C). Buňky byly promyty v 7 ml SM pufru (1200 × g, 10 minut, 4 °C). Následně byl pelet resuspendován ve 4 ml SM pufru s inhibitory proteáz cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) v koncentraci doporučené výrobcem. Takto promyté buňky byly poté homogenizovány za použití sonikátoru ve dvou 30sekundových intervalech (40% amplituda, 1sekundové pulzy). Homogenát byl centrifugován (2680 × g, 20 minut, 4 °C) a poté byla stanovena koncentrace proteinů v supernatantu, který byl následně naředěn PBS pufrem s přidanými inhibitory proteáz (Roche) na koncentraci proteinů 1,5 mg/ml. Z takto naředěného supernatantu bylo odebráno 40 µl vzorku, jež byl označen jako **A0**.

K naředěnému supernatantu byl přidán DSP cross-linker rozpuštěný v DMSO ve finální koncentraci 350 µM. Po zastavení reakce pomocí 50mM Tris bylo odebráno 40 µl vzorku, který byl označen jako **A1**. Poté byl ke zbylému vzorku přidán 5× Boiling pufr s přidanými inhibitory proteáz (Roche) a směs byla inkubována 10 minut ve vodní lázni o teplotě 80 °C, aby došlo k denaturaci proteinů a jejich solubilizaci. Následně byl supernatant

doplněn inkubačním pufrům s inhibitory proteáz do objemu 50 ml a jako kontrola bylo odebráno 40 μ l vzorku, označeného jako **A2**.

Ke zbylému supernatantu byly přidány magnetické kuličky s navázaným streptavidinem – Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen). Streptavidin přítomný na kuličkách má silnou afinitu k biotinu, který je díky BAP-tagu navázán na exprimovaném proteinu. Na jednu reakci bylo použito 120 μ l kuliček, které byly promyty 3 \times po dobu 5 minut v inkubačním pufru na rotátoru (Biosan). Po každém promytí byla zkumavka s kuličkami vložena na magnetický stojánek pro odsátí přebytečné tekutiny.

Po promytí byly magnetické kuličky resuspendovány v 500 μ l inkubačního pufru, přidány k 50 ml supernatantu a inkubovány 1 hodinu na rotátoru při PT. Po inkubaci byl vzorek s magnetickými kuličkami vložen do velkého magnetického stojánku a bylo odebráno 40 μ l roztoku s kuličkami jako vzorek **A3**. Zbytek supernatantu byl odsát a magnetické kuličky s navázanými proteiny byly promyty v inkubačním pufru po dobu 5 minut. Po promytí bylo odebráno 40 μ l vzorku včetně kuliček jako vzorek s označením **A4**. Následně byly kuličky s navázanými proteiny promyty v 1 ml PBS s inhibitory proteáz (Roche) na rotátoru (3 \times 5 minut). Po posledním promytí byla odebrána 1/5 vzorku, ze které bylo na magnetickém stojánku odsáto zbylé PBS a následně přidán vzorkový pufr a 20mM biotin. Takto připravený vzorek byl označen jako **A5**. Ze zbylých 4/5 vzorku byla na magnetickém stojánku odebrána veškerá tekutina a vzorky byly odeslány do Servisní laboratoře hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu na proteomickou analýzu. Míra signifikance byla určena pomocí Studentova t-testu s False Discovery Rate (FDR) = 0,05. Pro tuto analýzu byl použit program Perseus verze 1.6.15. (Tyanova et al., 2016) a analyzovaná data vizualizována jako volcano plot pomocí on-line programu VolcanoR (Goedhart & Luijsterburg, 2020) s parametry P-value = 0,02, fold change \geq 2.

Všechny kontroly byly rozvařeny ve vzorkovém pufru (10 minut, 95 °C). Pouze kontrola A1 byla rozvařena ve vzorkovém pufru bez 2-merkaptoetanolu, aby nedošlo k narušení vazby cross-linkeru na proteiny. Považené kontroly byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotu.

4.5.1.4. Proteomická analýza

Všechny níže popsané metody byly provedeny v Servisní laboratoři hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu.

4.5.1.4.1. Příprava buněk

Magnetické kuličky s navázanými proteiny byly inkubovány s 5mM tris(2-karboxyetyl)fosfinem (TCEP) po dobu jedné hodiny při 60 °C pro redukci disulfidických můstků. Tato suspenze pak byla blokována v roztoku obsahujícím 10mM metylmetanthiosulfonát (MMTS) po dobu 10 minut při 37 °C pro modifikaci thiolových skupin. Proteiny byly z magnetických kuliček uvolněny inkubací s 1 μ g trypsinu po dobu 16 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly kuličky odstraněny centrifugací a získaný supernatant byl acidifikován přidáním trifluoroctové kyseliny (TFA) o finální koncentraci 1 %. Deoxycholát sodný (SDC), který se ve vzorku vyskytoval kvůli přidání Boiling pufru během experimentu popsaném v předchozí kapitole, byl ze vzorku odstraněn pomocí etylacetátu.

4.5.1.4.2. Kapalinová chromatografie s kvantitativní hmotnostní spektrometrií

Peptidy byly resuspendovány v pufru obsahujícím vodu, 2% acetonitril a 0,1% TFA, načež byly separovány pomocí „Reversed phase“ kolony EASY-Spray (Thermo Fisher Scientific) za použití dvou mobilních fází. Mobilní fáze A obsahovala roztok vody a 0,1% kyseliny mravenčí a mobilní fáze B obsahovala roztok acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí. Peptidy byly eluovány po dobu 120 minut v gradientu od 4% do 35% mobilní fáze B. Eluované peptidy byly poté ionizovány elektrosprejem v plynné fázi a analyzovány na hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific).

Následovala tandemová hmotnostní spektrometrie, při které byla měřena MS² hmotnostní spektra v iontové pasti pomocí frakcionace prostřednictvím kolizní disociace s vyšší energií (HCD) s maximální injekční dobou 35 ms.

4.5.1.4.3. Analýza dat

Data byla analyzována a kvantifikována v programu MaxQuant verze 2.3.1.0. (Cox & Mann, 2008) s limitní hodnotou (FDR) 1 % pro proteiny a peptidy dlouhé minimálně 7 aminokyselin. Následně byla MS² hmotnostní spektra hledána pomocí vyhledávacího programu Andromeda proti vnitřní databázi *G. intestinalis* obsahující 12 665 proteinů.

Analýza dat byla poté provedena v programu Perseus verze 1.6.15. Hodnoty intenzit byly převedeny na binární logaritmus a použitím Studentova bilaterálního t-testu byla určena statistická významnost testovaného rozdílu středních hodnot intenzity daných proteinů mezi dvěma zkoumanými skupinami.

4.5.2. Knock-out genu *get1*

4.5.2.1. Příprava homologních ramének

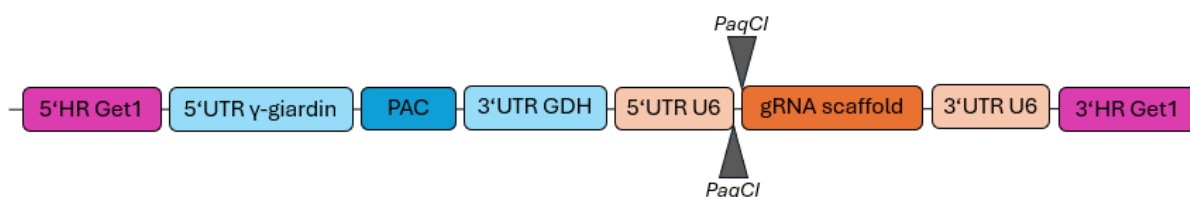
Z databáze GiardiaDB (Alvarez-Jarreta et al., 2024) byly vygenerovány 1000 bp dlouhé sekvence 5' UTR a 3'UTR oblastí genu *get1* (GL50803_14915). Poté byly navrženy primery pro amplifikaci oblastí tak, aby tyto oblasti neobsahovaly sekvence restrikčních míst využívaných pro zaklonování insertu do vektoru pGdelP_PaqCI. Po této optimalizaci byla naamplifikována 5'UTR oblast dlouhá 616 bp a 3'UTR oblast dlouhá 600 bp. Do sekvencí primeru byla také zahrnuta restrikční místa pro vložení do vektoru a také sekvence tří T či A pro správné nasednutí restrikčního enzymu (Tab. 21).

Tab. 21 - Primery pro 5' a 3'HR. Barevně jsou znázorněna restrikční místa.

Název	Sekvence 5'→3'
5'UTR_F_MluI	TTT ACGCGT GCTCTTCGATTTGCTTGTGCT
5'UTR_R_SpeI	TATA CTAGT GGAATTTTACTCCGTCATAAAT
3'UTR_F_ClaI	TTT ATCGAT GAGATATCAACTGACAACATTCAT
3'UTR_R_PacI	TTTT TAATTA ATAGATGGAGCACGCTACACG

4.5.2.2. Tvorba knock-outové buněčné linie Δ Get1

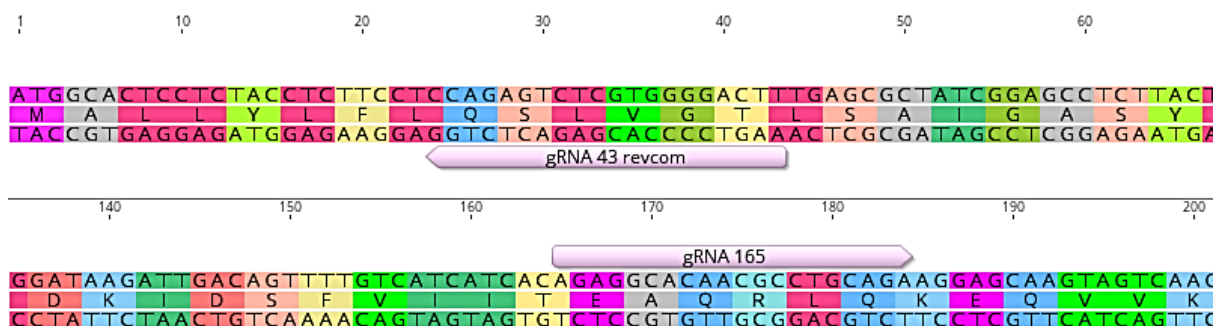
Naamplifikované sekvence byly následně zaklonovány do vektoru pGdelP_PaqCI, který obsahuje deleční kazetu pro vyštěpení genu. Tato kazeta je tvořena dvěma úseky. První úsek je tvořen genem pro PAC, obklopeným 5' a 3' UTR. 5'UTR oblast obsahuje sekvenci pro promotor genu pro γ -giardin a 3'UTR oblast obsahuje sekvenci 3' UTR pro gen GDH. Druhý úsek, zajišťující transkripci gRNA, obsahuje gRNA scaffold, který je nutný pro interakci s Cas9 endonukleázou, a dvě restriční místa pro enzym *PaqCI*, která zajišťují vložení gRNA spaceru. Daný úsek je obklopen U6 (=spliceosomální U6 RNA) 5' UTR a 3'UTR (Obr. 18).

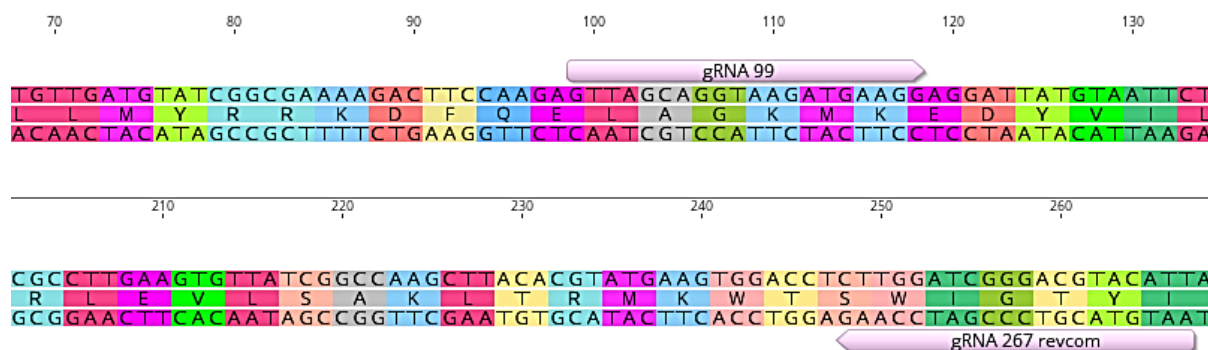


Obr. 18 – Schéma deleční kazety pro knock-out genu *get1*. Modře je znázorněn gen zajišťující rezistenci vůči puromycinu obklopený 5'UTR oblastí pro gen γ -giardin a s 3'UTR oblastí pro GDH. Oranžově je znázorněn úsek s již přítomným gRNA scaffoldem, do kterého bude přes restriční místa *PaqCI* zaklonován gRNA spacer. Tento úsek je obklopen 5'UTR a 3'UTR oblastmi genu pro *U6 snRNA*. Mezi 5'UTR U6 a gRNA scaffoldem se pak nacházejí restriční místa pro vložení gRNA spaceru do vektoru. Celá kazeta je obklopena 5' a 3' UTR oblastmi genu *get1*.

4.5.2.3. Příprava a klonování gRNA

Pomocí nástroje EuPaGDT (Peng & Tarleton, 2015) byly navrženy gRNA oligonukleotidy o velikosti 20 bp, které jsou komplementární k místům v sekvenci genu *get1* (Obr. 19). U navržených gRNA byla ověřena absence sekvence, která by odpovídala sekvenci restričního místa pro *PaqCI*, neboť tímto enzymem je štěpen vektor pro zaklonování dané gRNA. Ke každému oligonukleotidu byly přidány krátké přesahy na 5' konec, které jsou komplementární k přesahům v sekvenci vektoru naštěpeném enzymem *PaqCI*. U Fwd primeru se jednalo o sekvenci CGGC, u Rev primeru pak o sekvenci AAAC (Tab. 22). Po asociaci komplementárních oligonukleotidů tyto přesahy umožňují ligaci do vektoru naštěpeného enzymem *PaqCI*.





Obr. 19 – Poloha navržených gRNA vůči sekvenci genu *get1*.

Tab. 22 – Primery navržené pro klonování gRNA do vektoru pGdelP_PaqCI. Čísla u dané gRNA znázorňují počátek gRNA relativně k začátku genu. Přesahy umožňující správné zaklonování, neboť jsou tvořeny sekvencemi komplementárními k sekvencím ve vektoru, jsou znázorněny šedě.

Název	Sekvence 5'→3'
Get1_43_revcom_F	CGGCAAGTCCCCACGAGACTCTGG
Get1_43_revcom_R	AAACCCAGAGTCTCGTGGGGACTT
Get1_99_F	CGGCGTTAGCAGGTAAGATGAAGG
Get1_99_R	AAACCCTTCATCTTACCTGCTAAC
Get1_165_F	CGGCAGAGGCACAACGCCTGCAGA
Get1_165_R	AAACTCTGCAGGCGTTGTGCCTCT
Get1_267_revcom_F	CGGCAATGTACGTCCCGATCCAAG
Get1_267_revcom_R	AAACCTTGGATCGGGACGTACATT

Oligonukleotidy byly naředěny v dH₂O na koncentraci 100 μM a byla sestavena reakce umožňující párování komplementárních oligonukleotidů (Tab. 23). Směs byla inkubována v termobloku (Eppendorf) 5 minut při teplotě 95 °C. Po krátké inkubaci byl termoblok vypnut a reakční směs v něm byla 2,5 hodiny nechána pozvolně vychladnout. Pomalé ochlazování je klíčové pro správnou hybridizaci oligonukleotidů.

Tab. 23 – Reakční směs pro hybridizaci oligonukleotidů. Celkový objem činil 20 μl.

Složení	Množství
Oligo Fwd (100 μM)	2 μl
Oligo Rev (100 μM)	2 μl
10x T4 DNA ligázový pufr (Thermo Fisher Scientific)	2 μl
dH ₂ O	14 μl

Poté byla sestavena restriční/ligační reakce pro vložení vytvořených oligonukleotidů do plazmidu pGdelP_PaqCI (Tab. 24). Reakce byla inkubována v termocycleru (2 hodiny, 37 °C) a po inkubaci byla zvýšena teplota pro inaktivaci ligázy a restričních enzymů (10 minut, 65 °C).

Tab. 24 – Reakční směs pro zaklonování gRNA oligonukleotidů do plazmidu pGdelP_PaqCI. Celkový objem činil 20 μ l.

Složení	Množství
Pufr rCutSmart (New England Biolabs)	2 μ l
Plazmid pGdelP_PaqCI (100 ng/ μ l)	1 μ l
gRNA oligonukleotidy z předchozí reakce	1 μ l
PaqCI enzym (NEB)	1 μ l
PaqCI aktivátor (NEB)	0,5 μ l
T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific)	1 μ l
dH ₂ O	13,5 μ l

Po dokončení klonování byl plazmid obsahující gRNA oligonukleotidy pomocí tepelného šoku (30 s, 42 °C) transformován do bakterií podle popisu v kapitole 4.4.4 a poté byla plazmidová DNA izolována stejně, jako je popsáno v kapitole 4.4.5.

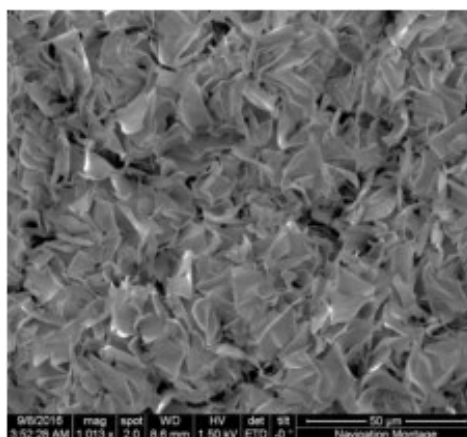
4.5.2.4. Nanopore sekvenování

Knock-outová linie Δ Get1 byla pro odhalení potenciálně vzniklých somatických mutací analyzována pomocí Nanopore sekvenování. Tento způsob charakterizace modifikovaného genomu *G. intestinalis* také posloužil jako potvrzení úspěšného vyštěpení genu *get1*.

Všechny níže zmíněné experimenty byly provedeny v Laboratoři mikrobiologie a imunologie na Uppsala Universitet.

4.5.2.4.1. Izolace gDNA

K izolaci gDNA pro účely Nanopore sekvenování bylo nutné izolovat gDNA tvořenou co nejdelšími úseky nukleové kyseliny bez fragmentace, tzv. high molecular weight (HMW) DNA. K tomu byl využit Nanobind® CBB kit (PacBio). Tento kit obsahuje malý magnetický disk, jenž je pokrytý nanostrukturovaným křemičitým povrchem (Obr. 20). Tím je zajištěna velmi silná vazebná kapacita tohoto disku a díky tomu se na něj mohou vázat dlouhé úseky DNA bez fragmentace, což není možné při izolaci gDNA za použití magnetických kuliček či kolonek s křemičitanovým povrchem.



Obr. 20 – Struktura Nanobind magnetického disku s křemičitanovým povrchem (PacBio).

200 ml narostlé kultury bylo centrifugováno ($1000 \times g$, 15 minut, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Pelet byl promyt v 7 ml ledově vychlazeného PBS ($1000 \times g$, 10 minut, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Poté byla provedena izolace gDNA za použití již zmíněného kitu podle protokolu „HMW (50-300+ Mb) DNA extraction protocol“. Výsledná koncentrace DNA byla kvantifikována pomocí kitu Qubit dsDNA BR kit a fluorometru Qubit 2.0, kvalita DNA byla určena na spektrofotometru NanoDrop 1000 v3.8.1.

4.5.2.4.2. Purifikace izolované gDNA

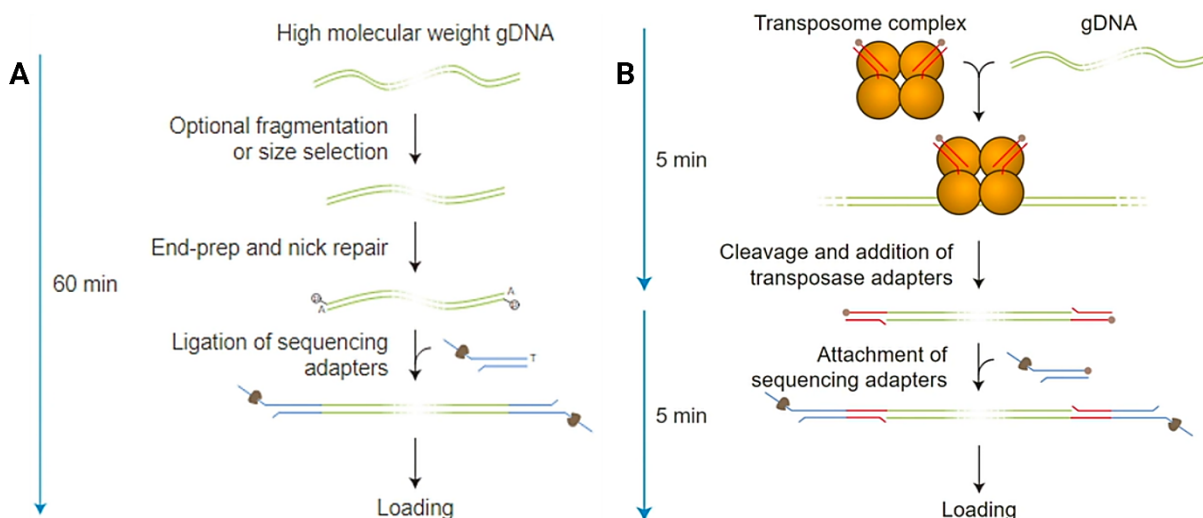
Pro Nanopore sekvenování je nutné, aby izolovaná gDNA byla co nejčistší – prostá RNA, proteinů a metabolitů, a proto bylo nutné provést dodatečnou purifikaci daných vzorků. Odstranění RNA byla provedeno RNázou A (QIAGEN) po dobu 30 minut při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla DNA přečištěna pomocí QIAGEN genomic-tip 20/G kitu a nakonec byl přebytečný etanol odstraněn pomocí AMPure XP beads (Beckman) Takto přečištěná gDNA byla eluována do $15 \text{ }\mu\text{l}$ nuclease-free dH_2O a vzorek byl inkubován 10 minut v $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Úspěšná purifikace byla ověřena na 0,7% agarózovém gelu pomocí horizontální gelové elektroforézy a koncentrace DNA byla opět stanovena pomocí fluorometru Qubit 2.0 a spektrofotometru NanoDrop 1000 v3.8.1.

4.5.2.4.3. Příprava sekvenační knihovny

Pro účely Nanopore sekvenování byly připraveny dva typy sekvenačních knihoven (Obr. 21). Jedním z nich byl Ligation-based Native Barcoding Kit 24 (SQK-NBD114.24) (Oxford Nanopore Technologies). Zde byl postup přípravy sekvenační knihovny následující: nejdříve proběhla úprava konců DNA fragmentů pro ligaci a na konce DNA fragmentů pak byla pro každý vzorek připojena unikátní barcode sekvence pro vzájemné odlišení vzorků. Následně byl k barcode sekvencím připojen adapter zajišťující průchod DNA sekvenačním pórem ve flow cell.

Druhým kitem pak byl Rapid Barcoding Kit SQK-RBK114.96. Příprava této sekvenační knihovny byla téměř totožná, avšak specifické barcode sekvence i adapterová sekvence byly připojeny společně náhodným procesem v tzv. transposome komplexu.

Takto připravené knihovny byly poté aplikovány na flow cell R10.4.1 sekvenačního přístroje MinIon Mk1C se softwarem MinKNOW™ v21.11.6.



Obr. 21 – Tvorba sekvenační knihovny dvěma různými přístupy. A) - tvorba sekvenační knihovny ligací adapterových sekvencí na konce DNA fragmentů; B) - tvorba sekvenační knihovny za použití tzv. transposome komplexu. Převzato z (<https://nanoporetech.com/products/prepare>).

4.5.2.4.4. Sekvence a assembly genomu

Nukleotidy procházející sekvenačním pórem mění jeho odpor a neustálý proud nukleotidů se pak projevuje jako změna elektrického proudu. Pro získání sekvenačních *readů* je pak potřeba tento proud opět převést na sekvenci nukleotidů pomocí tzv. *basecallingu*. Ten byl proveden pomocí programu Dorado verze 0.4.1 (Chiou et al., 2023). Pomocí tohoto programu byly také odštěpeny sekvence adapterů. Sekvenační *ready* byly následně protříděny tak, aby zůstalo 90 % *readů* s nejlepší kvalitou a délkou.

Poté byl provedeno sestavení a alignment sekvenačních *readů* proti genomu *G. intestinalis* WB assembly (GCA_000002435.2-genomic) pomocí pluginu Mauve v programu Geneious Prime verze 2023.2.1 (<https://www.geneious.com>).

4.5.2.4.5. Analýza získaných dat

Získaná data byly analyzována v programu Geneious Prime verze 2023.2.1. Sekvenační *ready* byly namapovány na chromozomy genomu *G. intestinalis* a podmínky pro detekci mutací byly nastaveny následovně: coverage = 10, variant frequency ≥ 20 %. V potaz byly brány pouze polymorfismy v kódujících oblastech. Tato data byla poté ještě ručně filtrována k odstranění synonymních mutací, které se u exprimovaného proteinu nijak neprojeví v jeho primární struktuře. Následně byly mezi sebou porovnány mutace u studovaného kmene s kontrolním a byly odfiltrovány mutace shodné pro oba kmene. Také byly vyřazeny polymorfismy v genech, které se v genomu objevují ve velkém množství podobných kopií a na které mohly být sekvenační *ready* špatně namapovány (např. geny pro VSP či proteiny obsahující ankyrinovou repetici).

4.5.2.5. Izolace RNA a příprava cDNA

Při experimentech popisujících úspěšnost odstranění genu *get1* byla nepřítomnost tohoto genu u knock-outové linie buněk ověřena pomocí PCR s využitím komplementární DNA (cDNA) jako templátu.

Z plně narostlé kultury byla vyizolována RNA pomocí High Pure RNA Isolation Kitu (Roche). Během izolace bylo postupováno dle protokolu od výrobce.

Následně byla odstraněna zbytková DNA kontaminace. Ke 48 μ l vyizolované RNA bylo přidáno 5 μ l 10 \times reakčního pufru s MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific) a 1 U/ μ l DNázy I (Thermo Fisher Scientific). Tato směs byla inkubována v termobloku 30 minut při 37 °C. Ke vzorku byly poté přidány 3 μ l 50mM EDTA a následovala 10minutová inkubace v termobloku při 65 °C za účelem inaktivace DNázy. Vyizolovaná RNA byla uchovávána při teplotě -80 °C.

cDNA byla připravena za použití kitu SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Do nuclease-free zkumavky byly napipetovány následující složky:

- 1 μ l 50 μ M oligo(dT)₂₀ primerů
- 10 μ l RNA (množství RNA však nesmí přesáhnout 5 μ g)
- 1 μ l 10mM DPT
- 1 μ l dH₂O

Celkový objem reakční směsi byl 13 μ l. Směs byla zahřáta v termobloku po dobu 5 minut při 65 °C a poté byla inkubována 1 minutu na ledu. Po inkubaci byly ke směsi přidány následující komponenty:

- 4 μ l 5 \times First-strand buffer
- 1 μ l 0,1M DTT
- 1 μ l RNaseOUT Recombinant RNase inhibitor
- 1 μ l SuperScript III reverse transcriptase (200 U/ μ l)

Celá směs byla jemně promíchána pomocí pipety a inkubována 30 minut při 50 °C. Reakce byla následně inaktivována 15minutovou inkubací při 70 °C.

Výsledná cDNA i RNA byla testována pomocí PCR reakce. Byly použity primery pro přítomnost genu *get1* a jako pozitivní kontrola byly použity primery pro přítomnost genu *glukóza-6-fosfát-isomeráza (g6pi)* (GL50803_9115) (Tab. 25). Primery pro *g6pi* laskavě poskytla Mgr. Lenka Arboňová.

Tab. 25 – Primery použité pro PCR testování cDNA a RNA.

Primer	Složení
Get1_KO_RNA_check-F	ACCTCTTCCAGAGT
Get1_KO_RNA_check-R	CTTCCGGTGCCATTAGA
G6PI F	ATGCCGTCCATCCACGTCTC

G6PI R	TTAAGCTTTTGCAGCGTGAC
--------	----------------------

Pro PCR s *g6pi* primery byl použitý program Q5, pro PCR s *get1* primery pak program Emerald. V obou případech bylo při PCR reakci postupováno podle protokolu od výrobce.

4.5.2.6. Příprava buněk pro proteomickou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie

Všechny níže popsané metody byly provedeny v Servisní laboratoři hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu.

Buněčná kultura byla napěstována v 50 ml média. Po nárůstu buněk do monolayeru bylo z kultivační lahve odlito médium, lahev byla naplněna ledově vychlazeným, sterilním PBS a 20 minut ponechána na ledu. Následně byla kultura buněk centrifugována (1200 × g, 10 minut, 4 °C), a promyta v PBS (1200 × g, 10 minut, 4 °C). Po odsátí supernatantu byly takto připravené pelety odeslány do Servisní laboratoře hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu.

Tyto pelety byly dále lyzovány po dobu 10 minut při 95 °C v roztoku obsahujícím 2% SDC, 10mM TCEP pro redukci disulfidických můstků mezi proteiny a 40mM chloracetamid pro modifikaci volných cysteinů. Tento roztok byl doplněn hydrogenuhličitanem trietylamonným (TEAB) v koncentraci 100 mM. Následně byla suspenze homogenizována pomocí sonikátoru (Bandelin Sonoplus Mini 20, MS 1.5). Poté byla stanovena koncentrace proteinů za použití kitu BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) a 30 µg vzorku bylo použito pro navázání na magnetické kuličky podle protokolu „single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation“ (SP3) (Hughes et al., 2019). Vazba proteinů na magnetické kuličky, která je zprostředkována hydrofilními interakcemi, byla indukována přidáním etanolu do finální koncentrace 60 % a směs byla inkubována 5 minut při PT. Následně byly magnetické kuličky s navázanými proteiny promyty 80% etanolem. Proteiny byly štěpeny přes noc při 37 °C přidáním 2 µg trypsinu rozpuštěném ve 100mM roztoku TEAB. Naštěpené peptidy se během inkubace uvolnily z magnetických kuliček, které byly z roztoku po inkubaci odstraněny centrifugací. Vzorky byly okyseleny přidáním TFA ve finální koncentraci 1 % a peptidy byly odsoleny na odsolovací koloně domácí výroby za použití tzv. stage tips (Rappsilber et al., 2007).

Poté byla provedena kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a následná analýza dat tak, jak je uvedeno v kapitole 4.5.1.5.

4.5.3. Tvorba CRISPR/Cas9 rezistentního konstruktů

Pro vytvoření genového *add-backu* bylo nutné pozměnit několik bází v sekvenci genu *get1* v místech, ve kterých se váže konkrétní gRNA (Obr. 22), aby vnesený gen *get1* nemohl být rozštěpen Cas9 endonukleázou. Vkládání těchto bodových mutací však nesmí ovlivnit translaci – může tedy dojít ke změně v kodonu, ale ne ke změně aminokyseliny, kterou kóduje. Záměrem také bylo vyhnout se využití zřídka používaných kodonů, které by mohly způsobit komplikace při translaci. K tomu byla použita databáze Codon Usage

Database (Nakamura et al., 2000). K takto modifikované sekvenci genu *get1* pak byl na 3' konci připojen V5-tag.



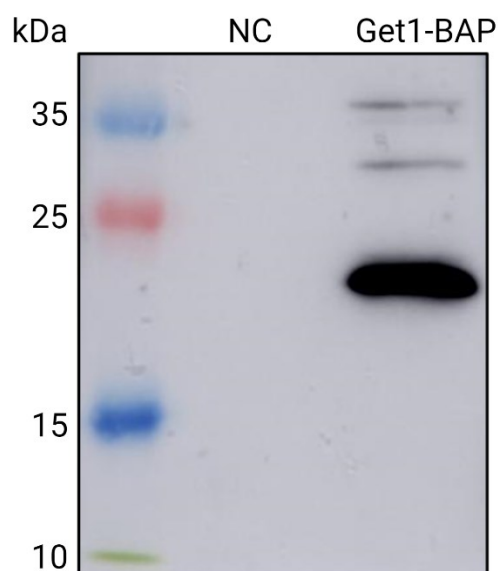
Obr. 22 – Schematické znázornění změny ve složení bazí u části sekvence genu *get1*. Dvojvlákno ve světle modrém poli je nativní sekvence *get1*, u které byly znázorněny pozice jednotlivých gRNA světle růžovou šipkou. Dvojvlákno v bílém poli pak znázorňuje částečně modifikovanou sekvenci *get1*, na kterou se navržené gRNA neváží. Žluté obdélníčky pak vyznačují pozměněné báze. V obou dvojvláknech jsou barevně vyznačené báze, které se od sebe odlišují. Lze si povšimnout, že úseky s pozměněnými bázemi kódují stále stejné aminokyseliny.

5. Výsledky

5.1. Overexprese Get1-BAP

5.1.1. Tvorba buněčné linie Get1-BAP v BirA

Pro vytvoření buněčné linie s epizomální expresí genu *get1* v buňkách *G. intestinalis* byl použit plazmid pOndra nesoucí sekvenci genu *get1* s BAP-tagem na C-konci. Tento plazmid byl transfekován do linie buněk obsahujících plazmid pTG se sekvencí genu pro biotin-ligázu (BirA). Tato linie byla pro transfekci vybrána z důvodu plánovaných experimentů – BirA umožňuje biotinylation proteinu s BAP-tagem po přidání biotinu do buněčné kultury. Transfekce proběhla za použití dvou množství plazmidové DNA – 10 µg a 50 µg, avšak kultura s menším množstvím DNA byla kontaminována a nadále se s ní nedalo pracovat. Po selekci geneticinem byl ze stabilně rostoucí kultury vytvořen lyzát a exprese Get1 byla ověřena pomocí SDS-PAGE a imunoblotu za použití primární monoklonální králičí α -BAP protilátky (Obr. 23).



Obr. 23 – Potvrzení exprese Get1-BAP v buňkách *G. intestinalis* kmene BirA. Protein byl detekován pomocí primární monoklonální králičí α -BAP protilátky a sekundární monoklonální α -králík protilátky spojené s HRP. Jako negativní kontrola (NC) byl použit lyzát z buněk kmene WB C6. Signál o velikosti 22 kDa znázorňuje protein Get1-BAP.

5.1.2. Potvrzení lokalizace Get1-BAP v endoplazmatickém retikulu

Po potvrzení exprese proteinu v buňkách již obsahujících BirA bylo přistoupeno k ověření lokalizace proteinu Get1-BAP, který by se měl nacházet v ER. K tomu byly použity dva přístupy – buněčná frakcionace s následným imunoblotem a imunofluorescenční mikroskopie.

5.1.2.1. Potvrzení lokalizace frakcionací

Abychom ověřili lokalizaci Get1-BAP v ER, bylo nutné vytvořit buněčné frakce. Pro ověření úspěšné frakcionace byly použity různorodé markery specifických buněčných struktur.

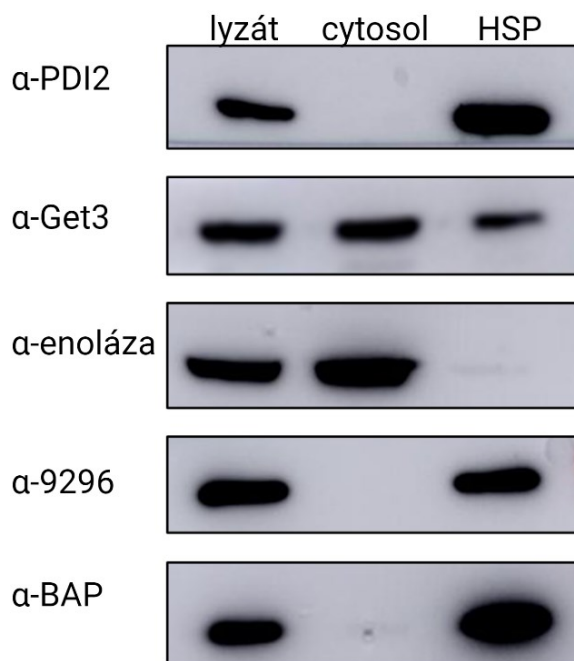
Pro ověření, že v high-speed peletu (HSP) se skutečně nachází ER, byla využita protilátka proti protein disulfidizomeráze 2 (PDI2). PDI2 je chaperon o velikosti 50 kDa nacházející se v membráně ER, který zajišťuje správné skládání proteinů (Ali et al., 2016).

Jako částečný marker ER a částečný marker cytosolu byla využita protilátka proti Get3. Get3 je cytosolickým proteinem GET dráhy s ATPázovou aktivitou, který zároveň interaguje s proteiny v membráně ER. Má také chaperonovou funkci a díky četným interakcím s ostatními proteiny lze tuto protilátku brát i jako marker endomembránového prostoru. Jeho velikost činí 40 kDa (Borgese et al., 2019).

Jako marker cytosolu byla použita protilátka proti enoláze. Enoláza je cytosolický protein účastnící se glykolýzy a jeho velikost činí 50 kDa (Castillo-Romero et al., 2012).

Pro ověření kvalitně provedené frakcionace byl využit i marker mitosomů, protilátka proti proteinu GL50803_9296. Mitosomy by se, stejně jako ER, měly nacházet v HSP. Velikost tohoto proteinu činí 25 kDa (Martincová et al., 2015).

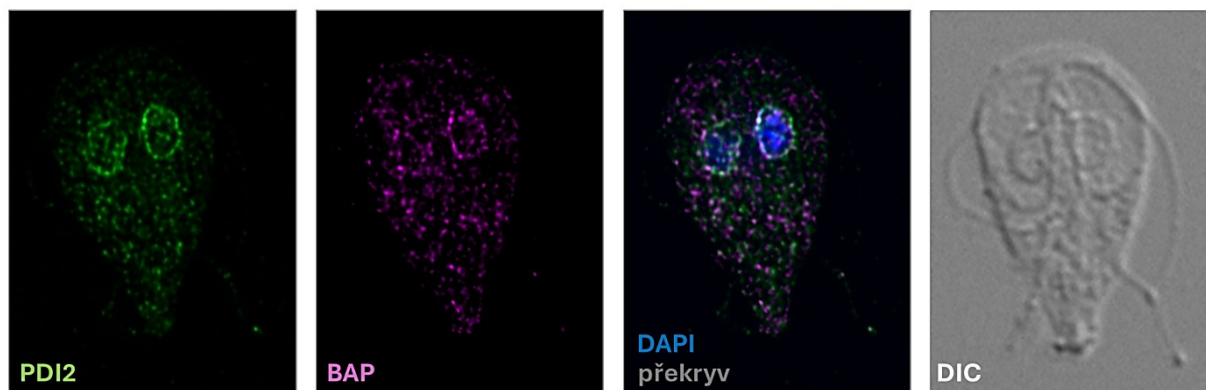
Analýza pomocí SDS-PAGE a imunoblotu ukázala, že frakcionace byla úspěšná a že Get1-BAP se pravděpodobně nachází v ER, neboť byl pozorován výrazný signál v HSP (Obr. 24).



Obr. 24 – Výsledek frakcionace buněk *G. intestinalis* obsahujících plazmid s Get1-BAP a plazmid s BirA. Primární polyklonální krysí **α-PDI2** protilátka byla použita jako marker ER pro důkaz úspěšné frakcionace – ER se opravdu nachází v HSP. Primární polyklonální krysí **α-Get3** protilátka byla použita pro potvrzení lokalizace tohoto proteinu jak v cytosolu, tak částečně v ER. Primární polyklonální krysí protilátka **α-enoláza** sloužila jako marker cytosolu. Primární polyklonální králičí protilátka **α-9296** byla použita pro potvrzení přítomnosti mitosomů v HSP. Primární monoklonální myší **α-BAP** protilátka byla použita pro důkaz, že Get1-BAP se pravděpodobně opravdu nachází v ER, neboť v HSP lze pozorovat výrazný signál. Pro vizualizaci signálů byly použity adekvátní sekundární monoklonální protilátky spojené s HRP.

5.1.2.2. Potvrzení lokalizace fluorescenční mikroskopii

Pro ověření lokalizace Get1-BAP v ER byly vytvořeny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii. Get1-BAP byl vizualizován pomocí primární monoklonální myši α -BAP protilátky a sekundární protilátky α -myš označené fluoroforem Alexa 594. Jako marker ER pro kontrolní vizualizaci byla využita primární polyklonální krysí α -PDI2 protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488 (Obr. 225). Ze snímků je patrné, že Get1-BAP a PDI2 spolu částečně kolokalizují, čímž lze potvrdit lokalizaci Get1-BAP v ER.

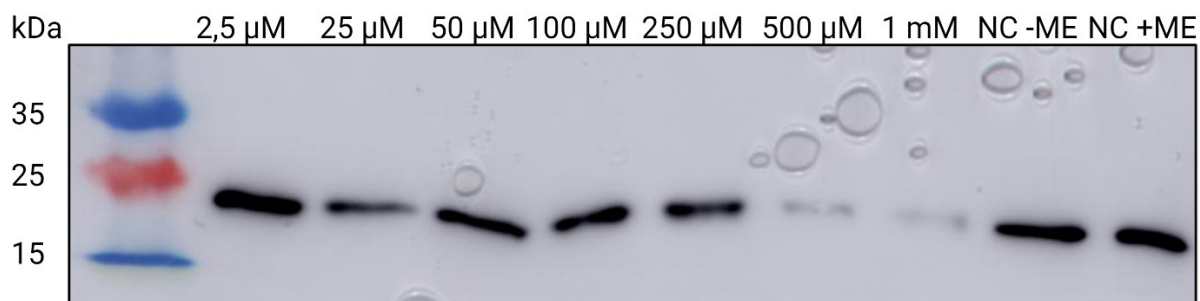


Obr. 25 – Ověření lokalizace Get1-BAP v ER v buňkách *G. intestinalis* exprimujících také BirA. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou metodou. Snímky jsou výsledkem projekce maximální intenzity. Pro vizualizaci ER byla použita primární polyklonální krysí α -PDI2 protilátka spolu se sekundární monoklonální protilátkou α -krysa označenou fluoroforem Alexa 488 (zeleně). Pro zjištění lokalizace Get1-BAP byla použita primární monoklonální myši α -BAP protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -myš označená fluoroforem Alexa 594 (tmavě růžově). Překryv značí částečnou kolokalizaci mezi těmito markery, čímž lze potvrdit, že Get1-BAP se nachází v ER (bílé signály na snímku DAPI, překryv). Jaderná DNA je značena pomocí DAPI (modře). Snímek trofozoita ve viditelném spektru je zachycen pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

5.1.3. Hledání optimální koncentrace DSP pro chemický cross-linking

Aby mohla být provedena purifikace proteinu Get1 i s jeho interakčními partnery, bylo nejprve zapotřebí tyto proteinové interakce stabilizovat a zvýšit tak šanci jejich detekce. K tomu byl využit dithio(sukcinimidyl)propionát (DSP) cross-linker, který díky svým lipofilním vlastnostem může prostupovat membránou a je tedy schopen propojovat i membránové proteiny. Bylo však nutné zjistit, jaká koncentrace DSP cross-linkeru je pro stabilizaci proteinových interakcí v membráně optimální, neboť příliš vysoká koncentrace cross-linkeru by mohla vést ke vzniku příliš velkého proteinového komplexu z důvodu nespecifického připojení irelevantních proteinů. Bylo proto testováno několik různých koncentrací DSP cross-linkeru: 2,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 250 μ M; 500 μ M a 1 000 μ M. Každý ze vzorků byl inkubován při 95 °C po dobu 10 minut ve vzorkovém pufru bez 2-merkaptoetanolu, aby nedošlo k rozrušení disulfidických vazeb uvnitř DSP cross-linkeru a výsledky byly poté analyzovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotu (Obr. 26). Jako optimální

koncentrace pro další experiment bylo zvoleno 350 μ M DSP i přesto, že tato koncentrace nebyla testována. Při použité koncentraci 250 μ M ke cross-linkování ještě nedošlo, naopak při koncentraci 500 μ M lze vidět výrazný úbytek monomerů značící příliš výrazný cross-linking.



Obr. 26 – Testování DSP cross-linkeru na kultuře buněk *G. intestinalis* exprimujících Get1-BAP a BirA. Pro detekci signálu byla použita primární monoklonální králičí α -BAP protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -králík spojená s HRP. Všechny signály o velikosti cca 22 kDa značí přítomnost Get1-BAP ve vzorku. Slabé signály při hodnotách koncentrace DSP cross-linkeru 500 μ M a 1 mM ukazují na ubývání monomeru Get1-BAP ve vzorku, což indikuje úspěšný cross-linking. Jako negativní kontrola (NC) byly použity vzorky, do kterých nebyl přidán DSP cross-linker. Jeden vzorek byl inkubován ve vzorkovém pufru bez 2-merkaptoetanolu (NC -ME), jeden vzorek byl inkubován ve vzorkovém pufru s 2-merkaptoetanolem (NC +ME).

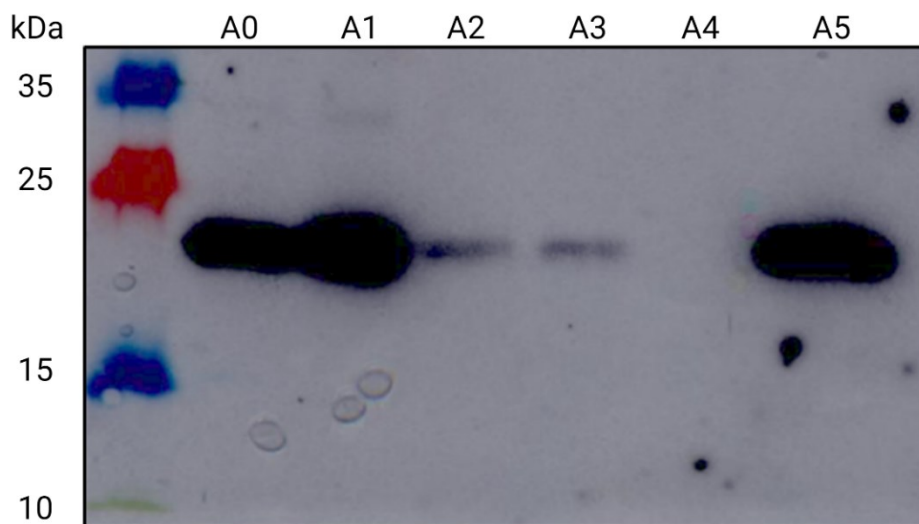
5.1.4. Hledání interakčních partnerů Get1 pomocí pull-down experimentu

DSP crosslinker v optimální koncentraci umožnil stabilizaci komplexu Get1 s jeho interakčními partnery. Poté bylo přistoupeno k purifikaci tohoto vzniklého komplexu pomocí pull-down experimentu s využitím magnetických kuliček Dynabeads® s navázaným streptavidinem. Celý experiment byl proveden v triplicátu a jako kontrola byly použity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6 exprimující BirA – mateřský kmen, do kterého byl plazmid s Get1-BAP vložen.

Kultura buněk byla po dosažení monolayeru sklizena opakovanou centrifugací a resuspendováním v PBS a následně SM pufru s přidáním inhibitory proteáz. Poté byla suspenze sonikována, centrifugována a finální pelet byl resuspendován v PBS s inhibitory proteáz tak, aby koncentrace proteinů ve vzorku činila 1,5 g/ml. Z této suspenze byla odebrána alikvóta **A0**. Následně bylo ke vzorku přidáno DSP o koncentraci 350 mM a po hodinové inkubaci byla reakce zastavena pomocí 50mM Tris a byla odebrána alikvóta **A1**. Následně byl ke vzorku přidán Boiling buffer s inhibitory proteáz, proteiny ve vzorku byly denaturovány při 80 °C a vzorek byl naředěn přidáním inkubačního pufru s inhibitory proteáz. Z této suspenze byla odebrána alikvóta **A2**.

Poté byly ke vzorku přidány magnetické kuličky Dynabeads® s navázaným streptavidinem. Kuličky byly promyty, přidány ke vzorku a suspenze byla inkubována na rotátoru (1 hodina, PT). Pro oddělení magnetických kuliček s navázanými proteiny od supernatantu a jejich následné promytí byla zkumavka se vzorkem umístěna na magnetický stojánek a po 15 minutách byl odebrán vzorek **A3**, který by měl být prostý kuliček. Poté byla suspenze s kuličkami promyta inkubačním pufrům a po vložení

zkumavky na magnetický stojánek byl odebrán supernatant, označený jako **A4**. Vzorky **A3** a **A4** by neměly obsahovat biotinylovaný protein, který by měl již být navázaný na kuličkách. Pro zrušení vazby biotinylovaného proteinu na kuličky byl k 1/3 objemu kuliček přidán 20mM biotin. Vzniklý vzorek **A5** by měl obsahovat velké množství uvolněného biotinylovaného proteinu i s jeho interakčními partnery. Všechny vzorky byly krátce povařeny ve vzorkovém pufru a výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotu (Obr. 27).



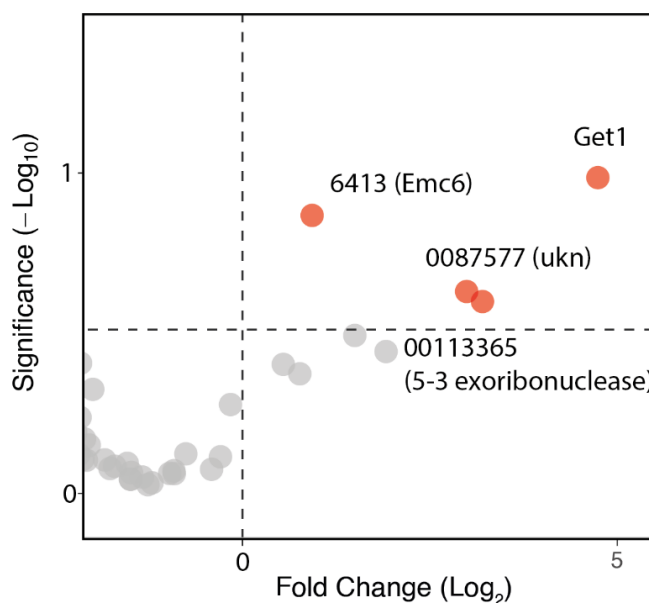
Obr. 27 – Izolace biotinylovaného proteinu Get1-BAP a jeho interakčních partnerů s využitím DSP cross-linkeru. Pro detekci signálu byla použita primární monoklonální králičí α -BAP protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -králik spojená s HRP. **A0** je vzorek odebráný po sonikaci a je zde patrná přítomnost biotinylovaného proteinu Get1-BAP, který má velikost cca 22kDa. Přítomnost Get1-BAP je viditelná i po přidání cross-linkeru ve vzorku **A1** a ve vzorku **A2** lze pozorovat rapidní pokles v množství proteinu po naředění vzorku inkubačním pufrům. Vzorek **A3** byl odebrán ze supernatantu po hodinové inkubaci s magnetickými kuličkami Dynabeads® s navázaným streptavidinem a po následném vložení zkumavky se vzorkem na magnetický stojánek. Vzorek **A4** byl odebrán po promytí vzorku navázaném na magnetické kuličky inkubačním pufrům. Ve vzorcích **A3** ani **A4** by se nemělo nacházet téměř žádné množství biotinylovaného proteinu, avšak ve vzorku **A3** vazba na kuličky nebyla optimální. Vzorek **A5** by měl obsahovat velké množství Get1-BAP, neboť ke vzorku byl přidán volný biotin, který se navázal na streptavidin, díky čemuž došlo k rozvolnění vazby mezi biotinylovaným proteinem a streptavidinem a Get1-BAP se tak mohl uvolnit z magnetických kuliček.

Ze zbylých 2/3 vzorku byl odebrán supernatant a pelet vysušených kuliček (od každé skupiny biologického triplikátu) byl odeslán do Servisní laboratoře hmotnostní spektrometrie v BIOCEVu, kde byla provedena analýza proteinového složení vzorku (Příloha 1). Pro analýzu získaných dat byl využit program Perseus verze 1.6.15., kde byla míra signifikance výsledků analyzována pomocí Studentova T-testu s FDR 5 %. Data byla následně vizualizována pomocí on-line programu VolcanoR jako volcano plot zobrazující míru signifikance nabohacení proteinů oproti kontrolnímu vzorku (Obr. 28).

Očekávaným interakčním partnerem proteinu Get1 (GL50803_14915) byl Get2 (GL50803_17617), neboť tyto dva proteiny spolu v ostatních eukaryotických organismech tvoří heterodimer či heterotetramer (Zalisko et al., 2017). Tento protein však v získaných

datech nebyl vůbec nalezen, což vedlo k domněnce, že spolu tyto dva proteiny v *G. intestinalis* možná neinteragují. Mezi signifikantně nabohacenými proteiny byl však nalezen protein GL50803_6413, který sekvenčně odpovídá proteinu EMC6. EMC6 je součástí EMC komplexu a jedná se o homolog proteinu Get2. S podivem je fakt, že proteiny EMC komplexu u *G. intestinalis* dosud nebyly nalezeny a chybí takřka u všech zástupců skupiny Metamonada (Wideman, 2015), tudíž se jedná o objev poutající pozornost a otevírá se hypotéza nasvědčující faktu, že Get1 neinteraguje s Get2, nýbrž s EMC6.

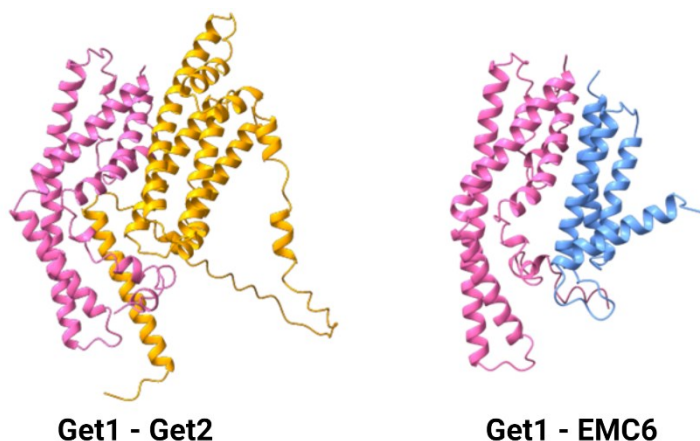
Sekvence kandidátního proteinu EMC6 byla následně analyzována pomocí programu HHpred (Söding et al., 2005), kde byla porovnána proti Pfam databázi. Jako protein EMC6 byla tato sekvence identifikována s 99% pravděpodobností. Dále byla predikována lokalizace a počet membránových domén tohoto proteinu pomocí programů DeepLoc verze 2.0 (Thumuluri et al., 2022), TMHMM verze 2.0 (Ganapathiraju et al., 2007) a TOPCONS (Bernsel et al., 2009). Získané predikce odpovídají lokalizaci a topologii proteinu u kvasinek – tento protein by se měl nacházet v ER a měl by obsahovat tři transmembránové domény (TMD). Výše zmíněné parametry přispěly k domněnce, že se jedná o funkční homolog EMC6 proteinu.



Obr. 28 – Znázornění potenciálních interakčních partnerů Get1 pomocí volcano plotu. Na grafu jsou zobrazeny signifikantně nabohacené proteiny. Data z hmotnostní spektrometrie byla analyzována v programu Perseus verze 1.6.15. Míra signifikance výsledků byla analyzována pomocí Studentova t-testu s FDR 5 %. Pro vizualizaci dat byl vytvořen Volcano plot v on-line programu VolcanoR. Vodorovná přerušovaná čára dělí volcano plot na dvě poloviny, přičemž v horní polovině se nacházejí proteiny se signifikantní změnou >2. Přerušovaná svislá čára pak dělí proteiny na ty se sníženou expresí (vlevo) a na proteiny nabohacené (vpravo). Get2 měl být očekávaným interakčním partnerem Get1, avšak v získaných datech nebyl vůbec nalezen. Mezi signifikantně nabohacenými proteiny však byl nalezen protein GL50803_6413 (EMC6), který je homologem proteinu Get2. Nabízí se tedy domněnka, že hlavním interakčním partnerem Get1 v *G. intestinalis* je EMC6 i přesto, že tento protein dosud nebyl v *G. intestinalis* ani u jiných zástupců skupiny Metamonada nalezen. Zbylé dva signifikantně nabohacené proteiny jsou proteiny s predikovanou cytosolickou lokalizací,

z nichž protein GL50803_00113365 má funkci exonukleázy. Funkce druhého proteinu s označením GL50803_0087577 je neznámá.

Pro nastínění interakce Get1 a jeho potenciálního proteinového interakčního partnera byly predikovány modely komplexů Get1-Get2 a Get1-EMC6 pomocí programu AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024) a vizualizovány v programu ChimeraX (E. C. Meng et al., 2023) (Obr. 29). Při opakovaných modelováních byla u komplexu Get1/Get2 pokaždé identifikována jiná vazebná rezidua zprostředkávající interakci proteinů. U komplexu Get1/EMC6 však byla i při opakovaném modelování identifikována stejná vazebná rezidua. To naznačuje vyšší stabilitu komplexu Get1/EMC6. Při charakterizaci počtu aminokyselinových reziduí mezi proteiny daných komplexů byla pozorována interakce většího množství reziduí mezi proteiny u komplexu Get1/EMC6 – zde je kontakt zprostředkován 18 AK Get1 a 20 AK EMC6. U modelu komplexu Get1/Get2 byla tato interakce slabší – kontakt byl pozorován pouze mezi 10 aminokyselinami Get1 a 8 aminokyselinami Get2. Z množství interagujících reziduí lze vyvodit sílu interakce mezi proteiny daného komplexu. pLDDT skóre popisující, do jaké míry dané namodelování odpovídá skutečnosti, bylo v případě komplexu Get1-EMC6 v místě vazby vyšší než u komplexu Get1/Get2. Ačkoliv vytvořené modely i experimentální data nasvědčují spíše interakci Get1 s EMC6, pLDDT skóre nebylo ani v jednom z případů dostatečně vysoké.



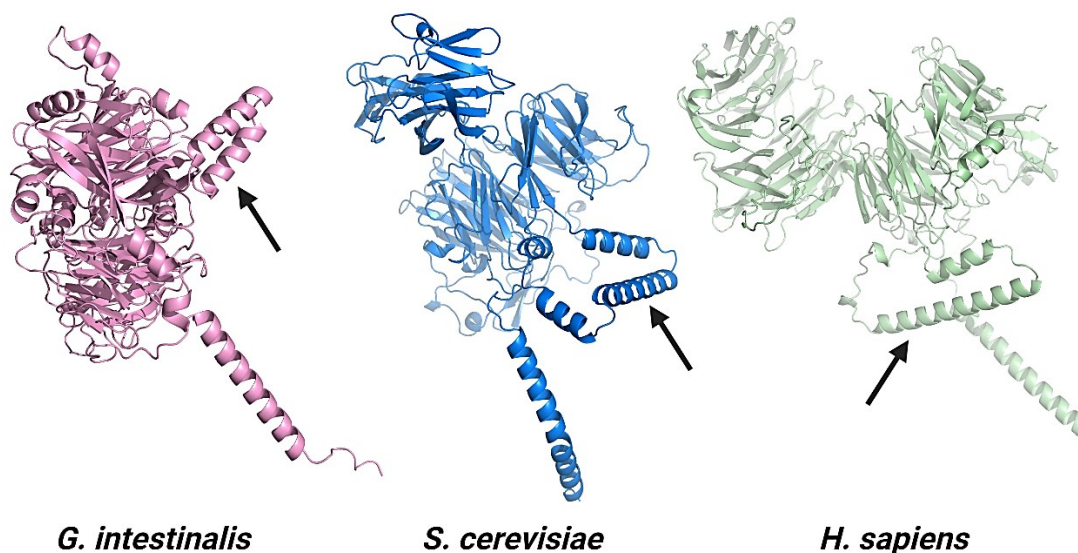
Obr. 29 – Modely komplexů Get1-Get2 a Get1-EMC6. Get1 je znázorněn růžově, Get2 oranžově, EMC6 světle modře. Modely byly predikovány v programu AlphaFold3 a vizualizovány v programu ChimeraX. Při opakovaných modelováních byla u komplexu Get1/Get2 pokaždé identifikována jiná vazebná rezidua, zatímco u komplexu Get1/EMC6 byla i při opakovaných modelováních nacházena stále stejná vazebná rezidua. Počet interagujících reziduí, který popisuje sílu interakce mezi proteiny daného komplexu, je téměř dvakrát vyšší u komplexu Get1/EMC6. Hodnota pLDDT skóre, která popisuje, do jaké míry odpovídá daný model skutečnosti, je u obou modelů nízká, v případě Get1/EMC6 komplexu je přesto o něco vyšší. Tato hodnota však není signifikantní. Z těchto výsledků lze usuzovat, že hlavním interakčním partnerem Get1 je pravděpodobně EMC6, což je podpořeno i experimentálními daty.

5.1.5. Nalezení dalšího kandidátního EMC proteinu

Nalezení kandidátního proteinu EMC6 vedlo k vytvoření domněnky, že GET dráha není jedinou drahou post-translačního transportu proteinů v *G. intestinalis*, jak se doposud předpokládalo. Rozhodli jsme se proto najít další možné podjednotky EMC komplexu. Při práci s bioinformatickým nástrojem FoldSeek, který zprostředkovává strukturní alignmenty pro identifikaci proteinových homologů (van Kempen et al., 2024), byl nalezen protein GL50803_15954, anotovaný jako EMC1. Tento protein je součástí EMC komplexu savců i kvasinek, který se vedle GET dráhy významně podílí na transportu TA proteinů. Pro protein EMC1 u *S. cerevisiae* i u *H. sapiens* je charakteristická přítomnost jedné TMD lokalizované na C-konci, signálního peptidu na N-konci a lokalizace v ER (Volkmar & Christianson, 2020). Za použití predikčních programů TOPCONS (Bernsel et al., 2009) SignalP verze 5.0 (Teufel et al., 2022) a DeepLoc verze 2.0 (Thumuluri et al., 2022) byly výše zmíněné parametry potvrzeny i u kandidátního proteinu EMC1 u *G. intestinalis* (Tab. 26). Sekvence tohoto proteinu byla také analyzována pomocí bioinformatického nástroje HHpred, kde byla jako protein EMC1 identifikována s pravděpodobností 98,81 %. Pro EMC1 podjednotky *G. intestinalis*, *S. cerevisiae* a *H. sapiens* byla také pomocí programu AlphaFold 3 predikována struktura a v programu Pymol verze 3.0.3 (<https://pymol.org>) byl proveden jejich strukturní alignment. Skóre signifikance alignmentu struktur *S. cerevisiae* a *G. intestinalis* bylo 119,5, což je 3x méně, než je skóre signifikance alignmentu struktur EMC1 podjednotky u *S. cerevisiae* a *H. sapiens*. Predikované modely struktur znázorňuje obrázek 30.

Tab. 26 – Porovnání topologie a lokalizace kandidátního proteinu EMC1 *G. intestinalis* s EMC1 podjednotkami *S. cerevisiae* a *H. sapiens*.

Použitý program	<i>G. intestinalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
TOPCONS	1 TMD na C-konci	1 TMD na C-konci	1 TMD na C-konci
SignalP 5.0	Signální peptid na N-konci	Signální peptid na N-konci	Signální peptid na N-konci
DeepLoc 2.0	ER	ER	ER



Obr. 30 – Strukturní alignment EMC1 podjednotky *G. intestinalis* (růžově), *S. cerevisiae* (modře) a *H. sapiens* (světle zeleně). Struktury byly predikovány v programu AlphaFold 3 a vizualizovány v programu Pymol verze 3.0.3. U všech struktur lze pozorovat TMD na C-konci, stejně jako lze pozorovat luminální doménu a α -helixy znázorňující horizontální doménu, která se nachází těsně pod membránou ER (doména tvořená α -helixy označena šipkou). Struktury byly pro větší přehlednost predikovány bez signálního peptidu.

Dále nás také zajímalo, jestli kandidátní protein EMC1 interaguje s některým z proteinů GET dráhy. Proto byla analyzována proteomická data z pull-down experimentů téměř všech proteinů GET dráhy u *G. intestinalis* (Get2, Get4, Get5, Bag6), které v naší laboratoři provedla Mgr. V. Najdřová, PhD. Možné interakce však nebyly nalezeny. Pro potvrzení, že se opravdu jedná o protein EMC1, by bylo nutné pozorovat interakci s podjednotkou EMC6 či další funkční důkaz.

5.2. Knock-out genu *get1*

5.2.1. Příprava konstruktů pro genový knock-out

Pro knock-out genu *get1* byly modifikací plazmidu pGdelP_PaqCI vytvořeny čtyři různé konstrukty obsahující kazetu pro vyštěpení *get1*, přičemž v každé jednotlivé kazetě byl jiný gRNA spacer. Do každého plazmidu bylo nejdříve zaklonováno 3' homologní raménko, poté 5' homologní raménko a jako poslední byl do plazmidu s homologními raménky zaklonován specifický gRNA spacer – gRNA 43, gRNA 99, gRNA 165 či gRNA 267 (číslo odpovídá poloze v sekvenci genu). Všechny výše zmíněné inserty byly nejdříve amplifikovány specifickými primery prostřednictvím PCR. Poté byla provedena restriční a ligační reakce pro vložení insertu do vektoru a vzniklý konstrukt byl transformován do *E. coli* kmene TOP10. Z narostlé bakteriální kultury byla izolována DNA a kvalita klonování byla ověřena následnou sekvenací.

5.2.2. Tvorba buněčné linie Δ Get1

Ze čtyř vytvořených plazmidů bylo pomocí transfekce vytvořeno celkem 8 buněčných linií s potenciálně vyštěpeným genem *get1*, neboť plazmidová DNA daných konstruktů byla pro elektroporaci použita vždy ve dvou množstvích – 10 μ g a 50 μ g. Konstrukty byly

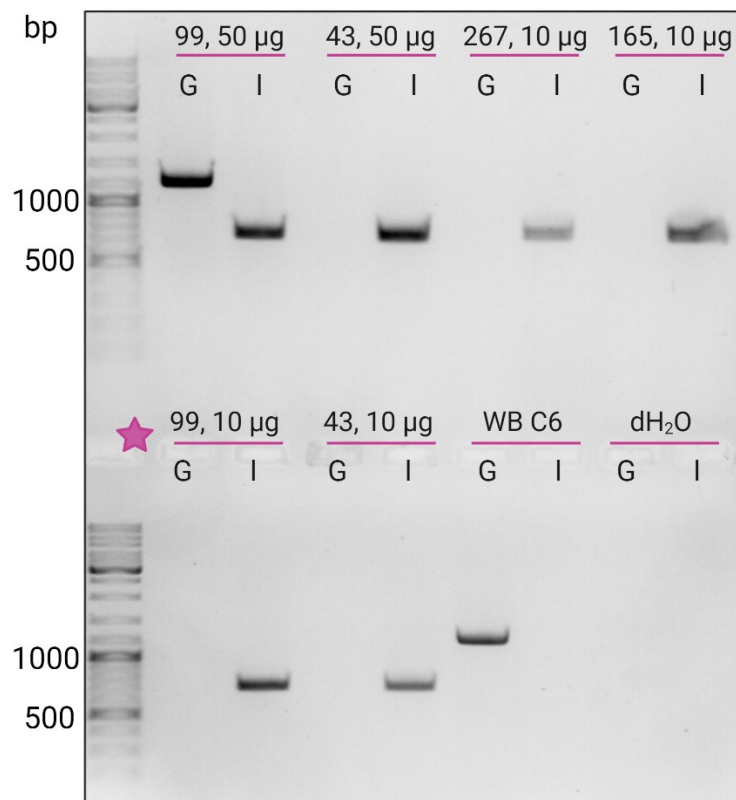
elektroporovány do buněčné linie WB C6 exprimující jaderně lokalizovanou Cas9 endonukleázu. Buňky byly po elektroporaci selektovány puromycinem až do dosažení buněčného monolayeru.

5.2.3. Potvrzení odstranění genu *get1*

Z osmi připravených linií dosáhlo plného monolayeru šest linií. Pro potvrzení plného knock-outu, tedy odstranění genu *get1* ve všech čtyřech alelách, bylo využito několik různých přístupů.

5.2.3.1. Ověření integrace konstruktů s deleční kazetou do genomu

Z úspěšně narostlých buněčných linií byla izolována gDNA a specifickými primery byla prostřednictvím PCR a horizontální gelové elektroforézy ověřena integrace konstruktů do genomu, ke které došlo procesem homologní rekombinace, a také případná přítomnost genu (Obr. 31). Jako kontrolní kmen pro přítomnost genu *get1* byla použita buněčná linie *G. intestinalis* kmene WB C6.



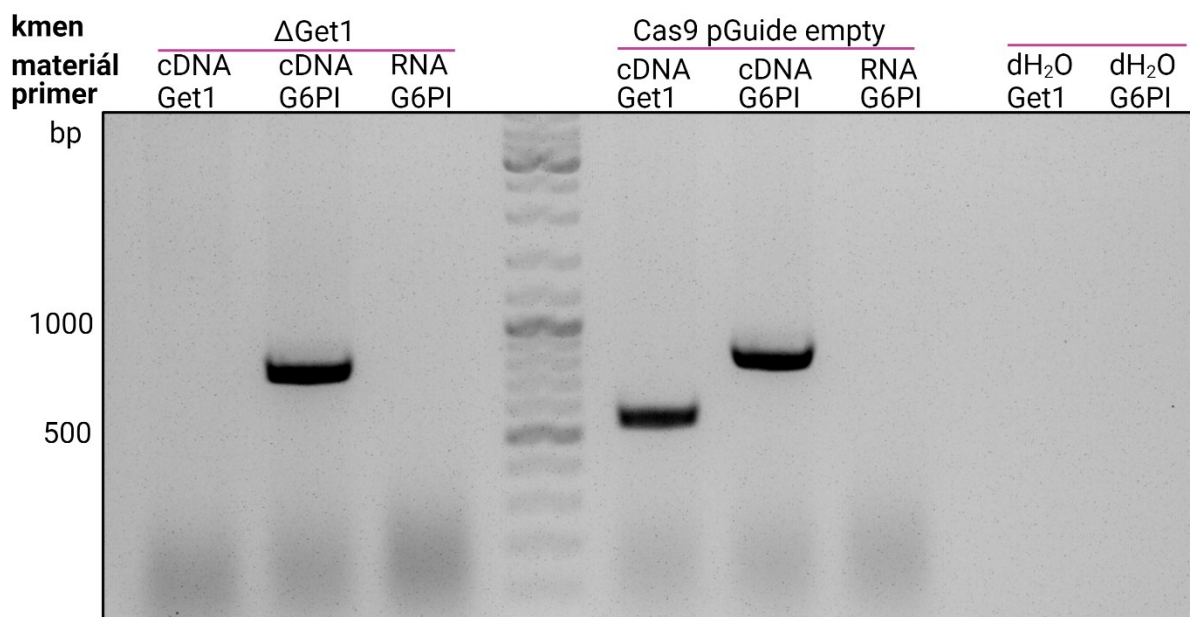
Obr. 31 – Ověření přítomnosti genu (G) a integrace konstruktů do genomu (I) po elektroporaci. Signály byly vizualizovány na horizontální gelové elektroforéze. Jednotlivá čísla značí konstrukt s konkrétním gRNA spacerem, za číslem je poté vždy uvedeno množství plazmidové DNA, které bylo použito pro elektroporaci. Dané buněčné linie byly testovány na přítomnost genu *get1* a na integraci konstruktů do genomu. Z obrázku lze vypožorovat odstranění genu *get1* téměř ve všech případech, pouze v buněčné linii s elektroporovanými 50 µg gRNA 99 bylo odstranění neúspěšné i přes to, že konstrukt byl očividně integrován do genomu. Naopak k integraci konstruktů došlo ve všech znázorněných případech. Jako pozitivní kontrola pro přítomnost genu *get1* byla použita gDNA z buněčné linie *G. intestinalis* kmene WB C6 a jako negativní kontrola byla použita dH₂O.

Pro všechny následující pokusy byla použita linie obsahující gRNA 99 s počátečním množstvím plazmidové DNA 10 µg, která je na snímku označena hvězdičkou.

Podle výsledků výše zmíněného experimentu byla pro všechny následující experimenty vybrána pouze jediná linie. Jednalo se o linii, do které bylo elektroporováno 10 µg plazmidové DNA obsahující gRNA 99.

5.2.3.2. Ověření odstranění genu *get1* na úrovni RNA

Úspěšné odstranění genu *get1* bylo potvrzeno také na úrovni mRNA. Z vybrané buněčné linie byla izolována RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána na cDNA. Pomocí primerů uvedených v kapitole 4.5.2.5. pak byla zjišťována přítomnost genu *get1*. Jako kontrola úspěšné izolace RNA a následné přípravy cDNA byly použity primery pro gen *g6pi*. Jako kontrolní linie pro přítomnost genů *get1* i *g6pi* byly využity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6 exprimující jaderně lokalizovanou Cas9 endonukleázu a obsahující plazmid pGuide bez gRNA spaceru, označovaném jako „Cas9 pGuide empty“. (Obr. 32). Tento kmen byl použit pro svou největší podobnost s kmenem obsahujícím vyštěpený *get1*. V knock-outové linii nedošlo k amplifikaci úseku genu *get1*, což dokazuje absenci tohoto genu i na úrovni RNA. Naopak gen *g6pi* byl amplifikován jak v knock-outové, tak v kontrolní linii, což potvrzuje úspěšnou izolaci RNA a přípravu cDNA.



Obr. 32 - Test přítomnosti mRNA genu *get1* v knock-outové linii ΔGet1 u *G. intestinalis*. Signály byly vizualizovány na horizontální gelové elektroforéze. Připravená RNA a cDNA byla testována na přítomnost úseku genu *get1* (560 bp) a také na přítomnost úseku genu *g6pi* (950 bp). Primery pro *g6pi* byly použity pro kontrolu správné izolace RNA a přípravy cDNA. Jako kontrolní linie byly vybrány buňky *G. intestinalis* kmene WB C6 exprimující Cas9 endonukleázu, který navíc obsahoval plazmid s deleční kazetou bez gRNA spaceru, označovaný jako „Cas9 pGuide empty“. V této kontrolní linii byla očekávána přítomnost jak úseku *get1*, tak *g6pi*. V cDNA připravené z knock-outové linie nebyl přítomen úsek genu *get1*, naopak úsek genu *g6pi* byl přítomen ve všech vzorcích. Vzorky s vyzolovanou RNA byly použity pro důkaz, že není kontaminována DNA.

5.2.3.3. Ověření odstranění genu *get1* pomocí Nanopore sekvenování

Ačkoliv sekvenace genomu knock-outové linie byla provedena zejména pro charakterizaci možných somatických mutací vzniklých tímto zásahem do genomu *G. intestinalis*, data získaná z tohoto experimentu slouží i jako další potvrzení úspěšného vyštěpení genu *get1*.

Sekvenační *reads* byly namapovány na chromozomy genomu *G. intestinalis* v programu Geneious prime verze 2023.2.1. Pro ověření vyštěpení genu *get1* nás zajímal zejména čtvrtý chromozom, na kterém je tento gen lokalizován. Sekvenační *reads* byly na tento chromozom namapovány celkově dvakrát – jednou na „přirozený“ chromozom, a podruhé na chromozom, do kterého byla *in silico* vložena deleční kazeta (Obr. 33). V případě namapování na přirozený chromozom obsahující *get1* bylo možné pozorovat velmi vysoké množství mutací, kde v podstatě žádný nukleotid neodpovídá předloze. Výrazné množství somatických mutací se taktéž vyskytovalo u sousedního genu ve směru 3' od *get1* – to je způsobeno větší délkou deleční kazety, než je délka samotného genu *get1*. Z těchto dat lze vyvodit, že v genomu knock-outové linie došlo k zásadním změnám v genetické informaci v místě, kde se má nacházet gen pro *get1*. V případě namapování sekvenačních *readů* na modifikovaný chromozom lze pozorovat ztrátu těchto mutací, což nasvědčuje faktu, že deleční kazeta byla procesem homologní rekombinace opravdu integrována do genomu v místě výskytu genu *get1* a tento gen se tedy v genomu knock-outové linie nevyskytuje a také, že sousední geny genu *get1* zůstaly intaktní.



Obr. 33 – Potvrzení odstranění genu *get1* pomocí Nanopore sekvenování. Oranžová a pastelově žlutá pole znázorňují konkrétní geny na čtvrtém chromozomu v genomu *G. intestinalis*. Obrázek A znázorňuje neshodující se nukleotidy na dané pozici mezi předlohou a konsenzem sekvenačních *readů* s *thresholdem* 20 % (svislé obdélníky okrové barvy) po namapování sekvenačních *readů* na „přirozený“ chromozom, obrázek B pak znázorňuje situaci po namapování sekvenačních *readů* na *in silico* modifikovaný chromozom, ve kterém byla oblast genu *get1* nahrazena deleční kazetou. Oba snímky byly vytvořeny v programu Geneious Prime verze 2023.2.1.

5.2.3.4. Ověření odstranění genu *get1* pomocí proteomické analýzy

Stejně jako v případě Nanopore sekvenování, i hmotnostní spektrometrie byla provedena primárně pro charakterizaci změn v knock-outové linii. I díky datům získaným z proteomické analýzy bylo možné opětovně potvrdit odstranění genu *get1* (Obr. 34, Příloha 2). Jako pozitivní kontrola pro přítomnost *get1* byly použity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6. Pro proteomickou analýzu byly použity lyzované buňky v triplicátu.

Pro ověření absence proteinu ve zkoumaném vzorku bylo analyzováno několik hlavních parametrů. Hodnota „fold change“, která popisuje reálnou změnu poměru intenzity proteinu v daném vzorku, byla vypočítána na základě porovnání aritmetických průměrů (Mean Δ Get1) intenzit u knock-outových a kontrolních vzorků. U knock-outové linie byla hodnota fold change proteinu Get1 označena jako NaN, což znamená, že hodnota intenzity proteinu v dané linii byla pod detekční hodnotou. Intenzita proteinu ve vzorku byla tedy buď velmi nízká, anebo nulová. Počet platných hodnot proteinu Get1 v procentech je nulový – znamená to, že tento protein nebyl nalezen ani v jedné ze tří skupin. V pozitivní kontrole byl pak Get1 nalezen ve 100 % případů.

Gene ID	Gene Name	Fold change	Mean Δ Get1	% of valid values Δ Get1	Mean WB	% of valid values WB
GL50803_14915	Get1	NaN	NaN	0,00	16,70	100,00

Obr. 34 – Potvrzení nepřítomnosti proteinu Get1 pomocí hmotnostní spektrometrie. Výřez z dat získaných analýzou výsledků z hmotnostní spektrometrie. Hodnota fold change označuje reálnou změnu poměru intenzity daného proteinu vůči kontrolním vzorkům. V případě knock-outové linie byl u proteinu Get1 tento poměr označen jako NaN, tzn., že množství proteinu se pohybovalo pod detekční hodnotou – intenzita proteinu byla tedy buď velice nízká, anebo nulová. Lze také pozorovat, že průměrná hodnota intenzity proteinu Get1 (Mean Δ Get1) je taktéž pod detekční hodnotou a počet platných hodnot v procentech je nulový. Tyto hodnoty naznačují nepřítomnost proteinu Get1 a slouží tedy jako další potvrzení úspěšného vyštěpení genu *get1* v knock-outové linii. Jako pozitivní kontrola byly využity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6. Zde je vidět, že průměrná hodnota intenzity proteinu Get1 nabývala detekovatelných hodnot a že platné hodnoty byly nalezeny ve 100 % případů.

5.2.4. Charakterizace knock-outové linie Δ Get1

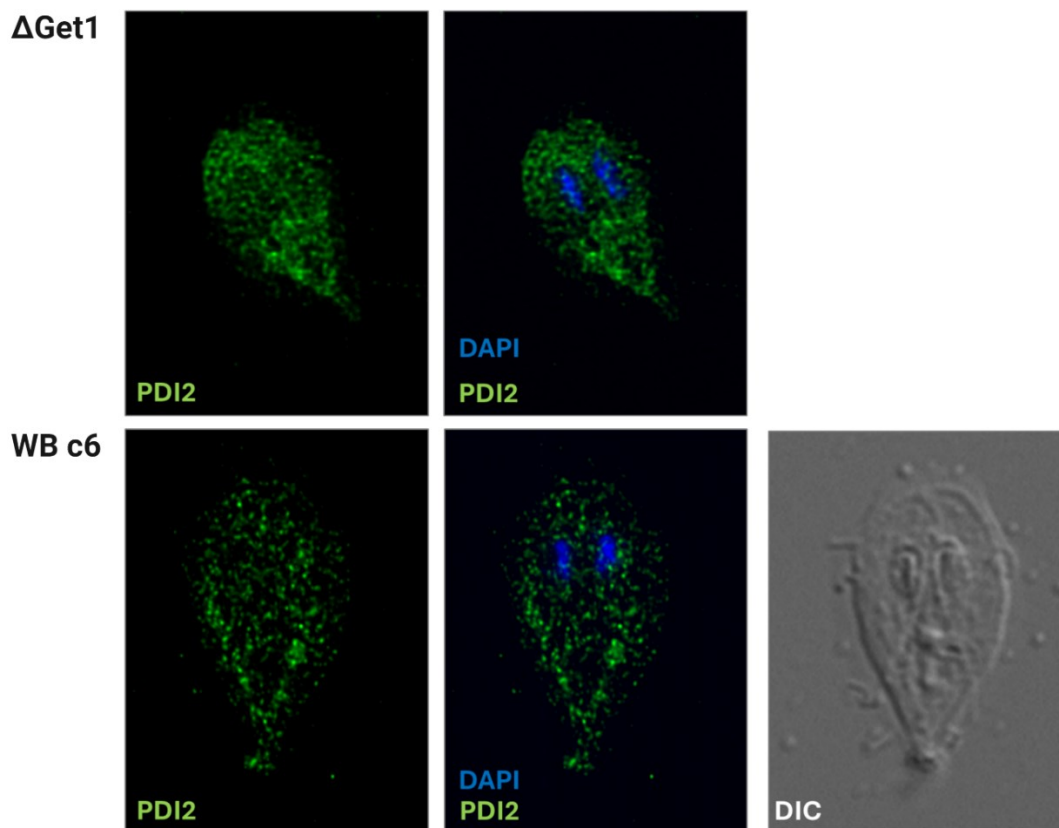
Po potvrzení úspěšného vyštěpení genu *get1* bylo v našem zájmu charakterizovat knock-outovou linii různorodými přístupy. K tomu byla využita imunofluorescenční mikroskopie pro pozorování případných fenotypových změn v buňce, encyzační experiment pro zjištění schopnosti encystace a pozorování možné deformace cyst a dále Nanopore sekvenování pro popis případných somatických mutací vzniklých modifikací genomu. V neposlední řadě byla knock-outová linie charakterizována pomocí dat z hmotnostní spektrometrie.

5.2.4.1. Imunofluorescenční mikroskopie

Pro charakterizaci fenotypu v knock-outové linii byly vytvořeny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii. Jako kontrolní kmen pro vizualizaci buněčných struktur byly použity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6, které nebyly narušeny žádným zásahem do genomu.

V první řadě bylo vizualizováno ER, neboť protein Get1 se nachází v jeho membráně a vyštěpení genu kódující tento protein mohlo vést ke změnám ve struktuře ER. Pro vizualizaci ER byla použita primární polyklonální krysí protilátka α -PDI2 a sekundární monoklonální protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488. Z pořízených snímků se ukázalo, že struktura ER knock-outové linie se zdá být podobná struktuře ER u kontrolního

kmenu. Lze se tedy domnívat, že odstranění genu *get1* nejspíše nemá vliv na strukturu ER (Obr. 35).

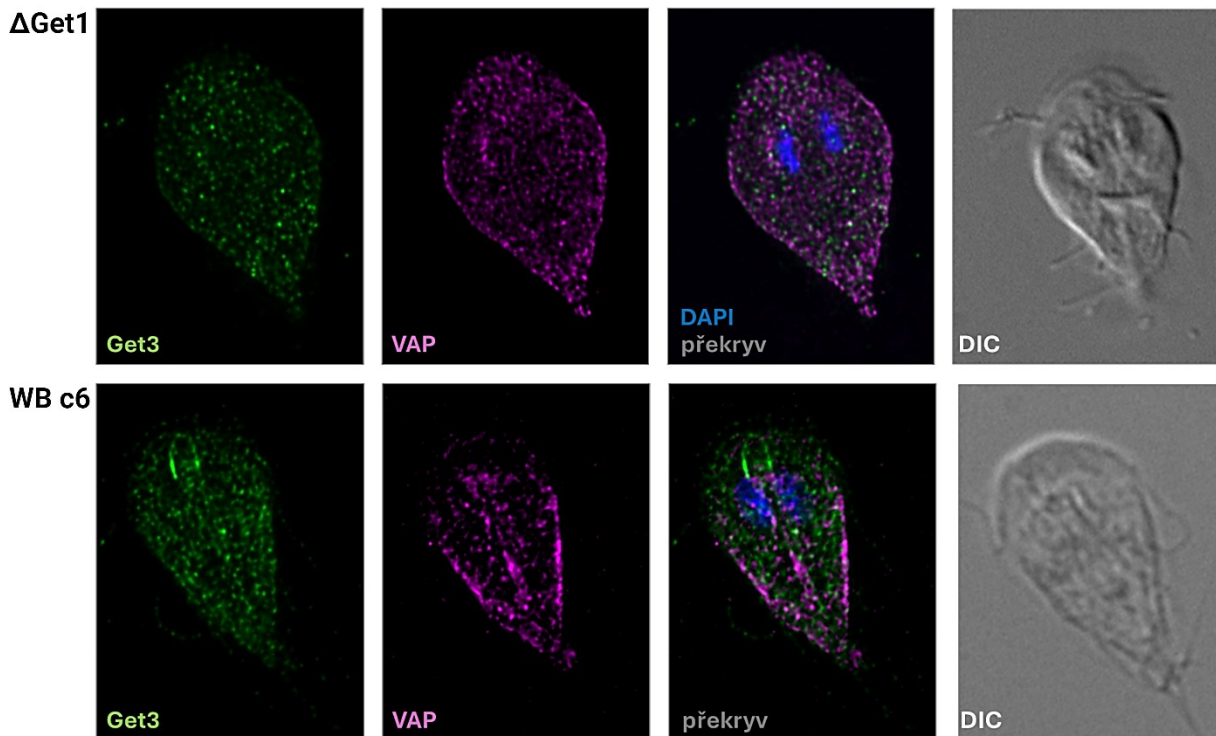


Obr. 35 – Vizualizace ER trofozoitů po vyštěpení *get1* u *G. intestinalis*. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou metodou. Snímky jsou výsledkem projekce maximální intenzity. Zeleně je značeno ER, pro jehož vizualizaci byla použita primární polyklonální krysí α -PDI2 protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488. Jaderná DNA je značena pomocí **DAPI** (modře). Snímek trofozoita ve viditelném spektru je zachycen pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (**DIC**), který bohužel u knock-outové linie nebyl pořízen. Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

Dále byl vizualizován endomembránový systém, k čemuž byly použity dvě protilátky: primární polyklonální krysí α -Get3 protilátka se sekundární monoklonální protilátkou α -krysa označenou fluoroforem Alexa 488 a dále primární polyklonální králičí α -VAP protilátka se sekundární monoklonální protilátkou α -králík označenou fluoroforem Alexa 594. Get3 je solubilní protein, který hraje významnou roli v transportu tail-anchored (TA) proteinů prostřednictvím GET dráhy. Při transportu TA proteinů interaguje s komplexem Get1/Get2 v membráně ER. Také má chaperonovou funkci, tudíž může figurovat jako marker proteinového stresu v buňce (Borgese et al., 2019). VAP (VAMP-associated proteins) označuje skupinu TA proteinů podílejících se na transportu lipidů, splývání membrán organel či majících podíl na exocytóze a lze je tedy také považovat za markery endomembránového systému (Kors et al., 2022). Lokalizace VAP je stejně jako u proteinu Get3 velice různorodá, neboť VAP přichází do kontaktu s velkým množstvím buněčných struktur. Protilátka proti

tomuto TA proteinu byla použita pro vizualizaci možné mislokalizace této skupiny proteinů (Obr. 36).

Při použití α -Get3 protilátky lze pozorovat rozdíl ve fenotypu mezi kmeny Δ Get1 a WB C6. Zatímco u kmene WB C6 protilátka proti Get3 značí mj. axonemy anterolaterálních bičků, u kmene Δ Get1 tomu tak není a axonemy značeny nejsou. U vizualizace VAP proteinu pak v obou kmenech lze pozorovat výskyt proteinů na periferii buňky, přičemž u kmene WB C6 je signál o něco výraznější. Lze také pozorovat, že v linii WB C6 α -VAP protilátka značí axonemy ventrálních bičků, což u knock-outové linie nepozorujeme. Při použití výše zmíněných protilátek nebyla očekávaná kolokalizace, ke které ani u jednoho kmene nedošlo.



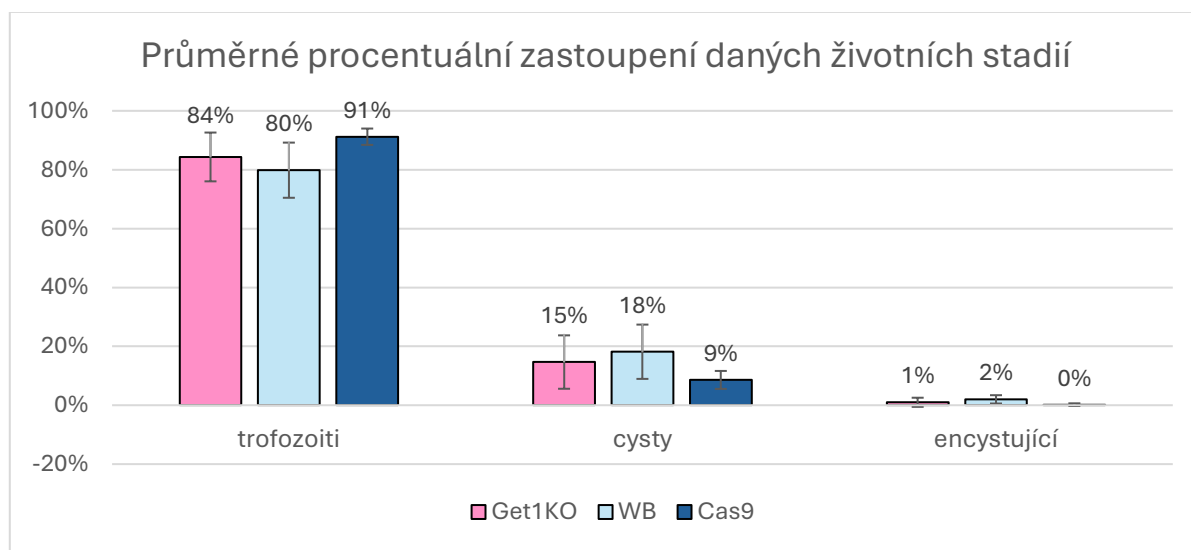
Obr. 36 – Vizualizace endomembránového systému trofozoitů po odstranění *get1* u *G. intestinalis*. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou metodou. Snímky jsou výsledkem projekce maximální intenzity. Pro vizualizaci Get3 byla použita primární polyklonální krysí protilátka α -Get3 a sekundární monoklonální protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488 (zeleně). VAP byl vizualizován primární polyklonální králičí protilátkou α -VAP a sekundární monoklonální protilátkou α -krysa označenou fluoroforem Alexa 594 (tmavě růžově). U zobrazení Get3 lze v knock-outové linii pozorovat ztrátu signálu u axonem anterolaterálních bičků, které jsou jasně značeny v kontrolním kmeni. U zobrazení VAP pak v obou kmenech lze pozorovat jasný signál na periferii buňky, který je v kontrolním kmeni nepatrně výraznější. α -VAP protilátka také u kontrolního kmene značí axonemy ventrálních bičků, což u knock-outové linie nepozorujeme. Kolokalizace při použití obou protilátek nebyla očekávaná a také k ní ani u jednoho kmene nedošlo. Jaderná DNA je značena pomocí DAPI (modře). Na snímku označeném jako DIC je buňka znázorněna ve viditelném spektru pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu. Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

5.2.4.2. Encystace knock-outové linie Δ Get1

Další možností, jak charakterizovat kmen Δ Get1, bylo použití encystačního experimentu. Otázkou bylo, zda budou buňky postrádající *get1* vůbec schopny encystace, neboť mezi TA proteiny, na jejichž transportu se Get1 podílí, patří i proteiny podílející se na exocytóze a exportu proteinů. Bez těchto proteinů by pak proces encystace v knock-outové linii nefungoval ideálně.

Buňky byly encystovány 48 hodin podle protokolu zmíněném v kapitole 4.1.2.1. Kromě kmene Δ Get1 byly jako kontrola použity dva kmeny buněk *G. intestinalis* – WB C6 a WB C6 exprimující Cas9 endonukleázu. Kmen WB C6 byl vybrán proto, že se jedná o kulturu buněk, do kterých nebylo nijak zasahováno a měly by tedy encystovat zcela přirozeně. Buňky WB C6 exprimující Cas9 byly vybrány pro vyloučení možné změny v encystaci způsobené přítomností plazmidu s genem pro Cas9 endonukleázou.

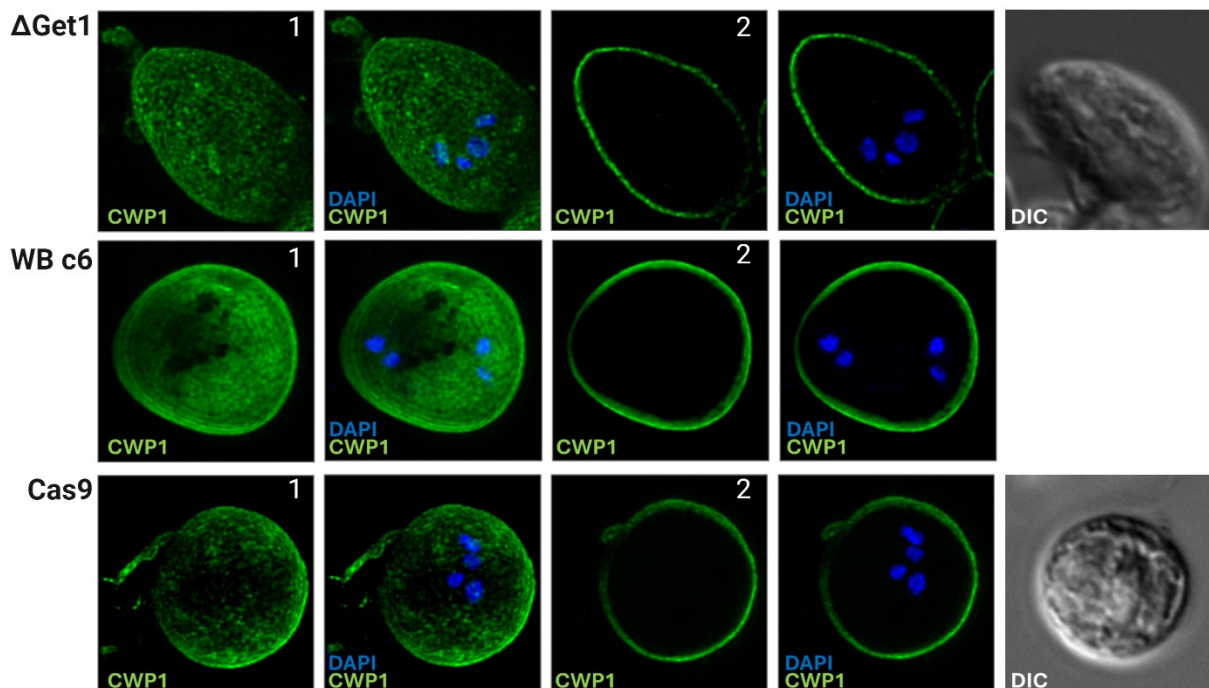
Po encystaci byly připraveny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii. Pro co nej přesnější statistickou analýzu byla encystace u všech kmenů provedena v hexaplikátu. Následovalo pozorování preparátů na invertovaném fluorescenčním mikroskopu, kdy bylo na každém preparátu analyzováno 100–250 buněk. Z výsledných hodnot bylo následně vypočítáno procentuální zastoupení jednotlivých životních stádií – trofozoitů, cyst a právě encystujících buněk (Obr. 37).



Obr. 37 – Graf popisující procentuální zastoupení daných životních stádií v jednotlivých kmenech. Kontrolní kmeny buněk *G. intestinalis* byly použity dva – WB C6 a WB C6 exprimující Cas9 endonukleázu. Z grafu lze vyčíst, že míra encystace u knock-outové linie (růžově) je podobná míře encystace u kmene WB C6 (světle modře) i u kmene WB C6 exprimujícího Cas9 (tmavě modře). Hodnota p-value však byla větší než 0,05, proto rozdíly mezi jednotlivými kmeni nelze brát jako statisticky signifikantní. Pro statistickou analýzu byl použit Bartlettův, Shapiro-Wilk test a míra encystace byla také charakterizována pomocí testu ANOVA. Vypočítaná hodnota p-value však u všech testů vyšla vyšší než 0,05, což znamená, že na 5% hladině významnosti se vzorky daných kmenů neliší.

Již během mikroskopie bylo zřejmé, že buňky knock-outové linie jsou schopny encystovat bez výraznějších problémů. Povrch těchto cyst se také nijak nelišil od povrchu cyst

kontrolních linií. Pro detailnější pozorování vzhledu cyst všech tří kmenů byly pořízeny snímky na invertovaném konfokálním mikroskopu (Obr. 38). Pro vizualizaci cystové stěny byla použita polyklonální myši α -CWP protilátka. Jedná se o primární protilátku, která je zároveň spojená se sekundární monoklonální α -myš protilátkou označenou fluoroforem Alexa 488. U cyst knock-outové linie nebyla pozorována žádná deformace či jiná změna ve fenotypu cysty a jejich vzhled se výrazně podobal vzhledu cyst u kmenů WB C6 a WB C6 s exprimovanou Cas9 endonukleázou.



Obr. 38 – Morfologie cyst různých linií *G. intestinalis*. Číslem 1 jsou označeny snímky celého povrchu cyst, číslem 2 je potom značen průřez danou cystou. Buňky byly fixovány paraformaldehydovou fixací 48 hodin po zahájení encystace. Snímky zobrazující povrch cysty jsou výsledkem projekce maximální intenzity, snímky znázorňující průřez cystou jsou pak vytvořeny ze tří vrstev. K vizualizaci cystové stěny byla použita α -CWP1 protilátka. Jedná se o primární polyklonální protilátku z myši, která je spojená se sekundární monoklonální α -myš protilátkou označenou fluoroforem Alexa 488. Jaderná DNA je značena pomocí DAPI (modře). Snímky cyst jsou ve viditelném světle zachyceny pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), který bohužel u cyst kmene WB C6 nebyl pořízen. Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

5.2.4.3. Nanopore sekvenování

Pro charakterizaci knock-outové linie bylo využito také Nanopore sekvenování, které bylo provedeno v Laboratoři mikrobiologie a imunologie na Uppsala Universitet. Hlavní otázkou bylo, jestli vlivem odstranění genu *get1* došlo k supresorovým mutacím v genomu, které by případně kompenzovaly vliv delece. Jako kontrolní linie byl vybrány buňky *G. intestinalis* kmene WB C6 exprimující Cas9 endonukleázu, který obsahoval plazmid s deleční kazetou bez gRNA spaceru, označovaný jako „Cas9 pGuide empty“.

Pro sekvenaci genomu výše zmíněných linií byly připraveny dva typy sekvenačních knihoven – jedna byla založena na úpravě konců vysokohmotnostních DNA fragmentů,

na které byly poté připojeny barcode a adapterové sekvence. Druhý typ sekvenační knihovny byl vytvořen pomocí tzv. transposome komplexu, ve kterém byly barcode i adapterová sekvence do DNA fragmentů náhodně vloženy. Obě knihovny byly postupně aplikovány na tzv. flow cell, ve které probíhalo sekvenování DNA fragmentů.

Produktem sekvenace byly sekvenační *ready*, které byly sestaveny, namapovány na chromozomy *G. intestinalis* WB c6 a následně analyzovány.

Získaná data odhalila u knock-outové linie pouze jedinou somatickou bodovou mutaci, která zároveň nebyla nalezena u kontrolního kmene Cas9 pGuide empty. Jedná se o substituční mutaci v genu GL50803_0024111, při které došlo ke změně aminokyseliny z valinu na alanin na pozici 34. Variant frequency činila 40 %, což naznačuje, že k substituci nedošlo na všech chromozomech, ale maximálně na jednom či dvou. GL50803_0024111 označuje protein interagující s C-terminální doménou RNA polymerázy II, který zároveň vykazuje i methyltransferázovou aktivitu.

5.2.4.4. Proteomická analýza Δ Get1

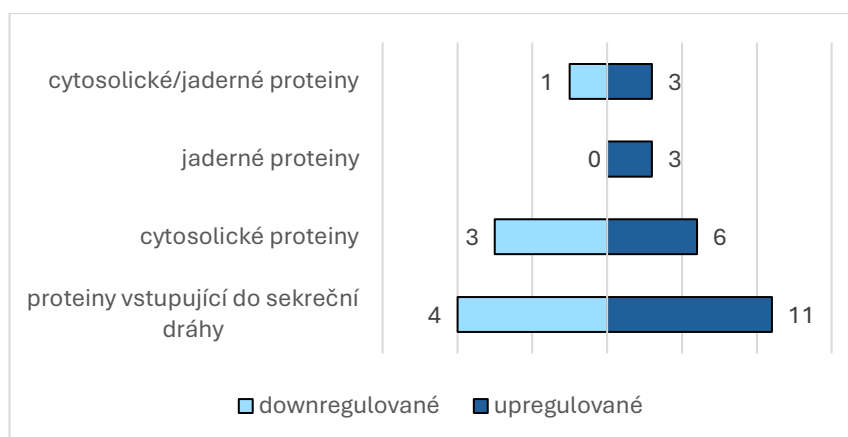
V neposlední řadě byla pro charakterizaci knock-outové linie využita proteomická analýza. Jako kontrolní linie byl využity buňky *G. intestinalis* kmene WB C6, který nebyl nijak modifikován. Pro proteomickou analýzu byly použity lyzáty buněk zkoumané i kontrolní linie v triplicátu.

Sledovány byly zejména proteiny, u kterých došlo k výraznější změně exprese – k jejímu snížení (=downregulace) či k jejímu zvýšení (=upregulace). Změna exprese byla charakterizována pomocí hodnoty tzv. fold change, která popisuje reálnou změnu v poměru intenzity proteinu zkoumané linie vůči linii kontrolní. Tato hodnota je rozdílem průměrů vytvořených z naměřených hodnot intenzit jednotlivých skupin daných linií, kdy hodnoty těchto intenzit byly nejdříve převedeny do binárního logaritmu.

Z analýzy byly vyřazeny proteiny, které se v proteomu *G. intestinalis* vyskytují ve velkém množství a jejichž variabilita může být přirozeně vysoká, takže získaná data mohou mít nízkou vypovídající hodnotu. Mezi tyto proteiny byly zahrnuty proteiny jako jsou VSP, proteiny s ankyrinovými repeticemi či high cysteine proteiny. Z analýzy byly vyřazeny také proteiny, jež se vyskytovaly jen v jedné skupině či byly ve vzorku zkoumané či kontrolní linie zastoupeny pouze v jednom replikátu.

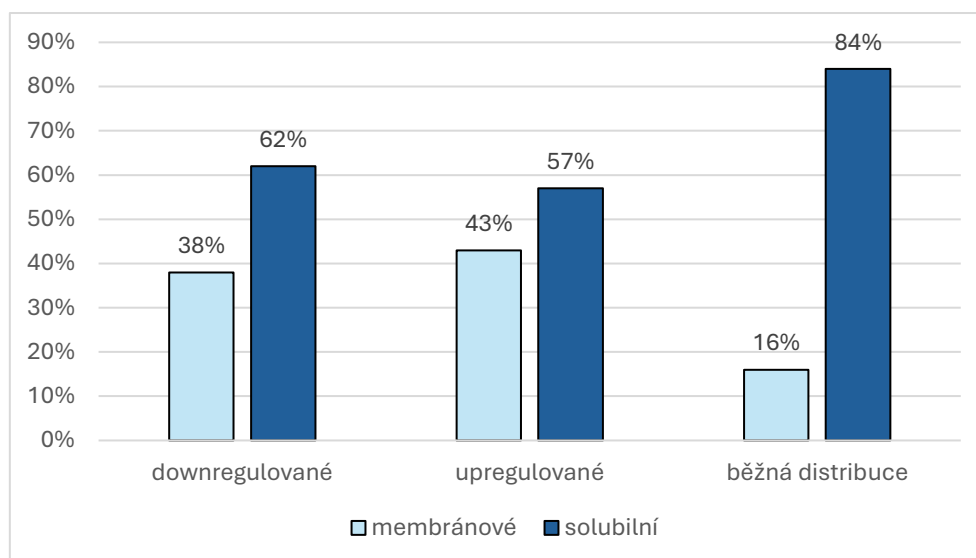
Porovnáním hodnot intenzit proteinů knock-outové linie s linií kontrolní byla zjištěna signifikantní změna v míře exprese celkem u 29 proteinů – u 8 proteinů došlo ke snížení exprese, u 21 proteinů došlo k jejímu zvýšení (Příloha 2). Prvním bodem byla predikce lokalizace změněných proteinů (Obr. 39). K predikci lokalizace byly využity bioinformatický nástroj DeepLoc verze 2.0 (Thumuluri et al., 2022). Podle predikovaných lokalizací pak byly proteiny rozděleny do čtyř hlavních skupin – jaderné proteiny, cytosolické proteiny, proteiny s nejistou lokalizací buď jadernou, nebo cytosolickou a proteiny vstupující do sekreční dráhy. Do poslední skupiny byly zařazeny proteiny s lokalizací v plazmatické membráně, proteiny organel a extracelulární proteiny, které jsou ko-translačně vkládány do ER a poté transportovány do místa určení. Ze získaných dat lze vyčíst, že absence genu *get1* měla

vliv zejména na expresi proteinů transportovaných přes ER. Signifikantně změněné proteiny s touto charakteristikou tvoří více než polovinu, resp. 52 %, ze všech signifikantně změněných proteinů. Jedná se o pozoruhodné zjištění, neboť proteiny vstupující do sekreční dráhy v buňkách *G. intestinalis* bez modifikace genomu tvoří pouhých 17 % z celkového množství proteinů. To naznačuje, že Get1 může skutečně mít vliv na vkládání proteinů do ER, jak je tomu i u jiných organismů.



Obr. 39 – Predikce lokalizace u proteinů se sníženou (světle modře) a zvýšenou (tmavě modře) expresí u knock-outové linie za použití predikčního programu DeepLoc verze 2.0. Celkový počet signifikantně změněných proteinů je 29, z toho u 8 proteinů došlo ke snížení a u 21 proteinů ke zvýšení exprese. Čísla popisují počet proteinů s danou predikovanou lokalizací. Signifikantně změněné proteiny byly podle predikované lokalizace rozděleny na čtyři hlavní skupiny. Do skupiny proteinů vstupujících do sekreční dráhy byly zařazeny proteiny plazmatické membrány, proteiny organel a extracelulární proteiny. Tyto proteiny jsou vkládány do ER a následně jsou transportovány do místa určení. Absence genu *get1* nejvíce poznamenala expresi proteinů transportovaných přes ER – poměr proteinů vstupujících do sekreční dráhy je třikrát vyšší než za normálních podmínek.

Jako další parametr pro charakterizaci knock-outové linie bylo zkoumáno množství solubilních a membránových proteinů, u kterých došlo ke změně míry exprese. Zajímalo nás, jestli odstraněním *get1* dojde k odchylce v poměru membránových a solubilních proteinů od standardního stavu v buňkách *G. intestinalis* bez modifikace genomu (Obr. 40). K predikci výskytu transmembránových domén byl využit program TMHMM verze 2.0. Tradiční zastoupení membránových proteinů v buňkách *G. intestinalis* tvoří 16 % z celkového množství proteinů. Toto zastoupení mohlo být absencí Get1, který je sám membránovým proteinem, ovlivněno. Skutečně, v knock-outové linii bylo u signifikantně změněných proteinů pozorováno zvýšení poměru membránových proteinů o více jak dvojnásobek jak u upregulovaných, tak u downregulovaných proteinů.



Obr. 40 – Grafické znázornění poměru mezi membránovými (světle modře) a solubilními (tmavě modře) proteiny vyskytujícími se ve skupinách proteinů knock-outové linie se sníženou expresí a s expresí zvýšenou. Výskyt transmembránových domén byl predikován pomocí programu TMHMM verze 2.0. Typické zastoupení membránových proteinů v buňkách *G. intestinalis* bez modifikace genomu tvoří 16 % z celkového množství proteinů. Z grafu lze vyčíst, že v signifikantně změněných proteinech byly podle očekávání více zastoupeny solubilní proteiny. U obou skupin signifikantně změněných proteinů však došlo k více jak dvojnásobnému zvýšení poměru membránových proteinů.

Proteom *G. intestinalis* pro porovnání proteomických dat s proteiny kmene WB C6 byl predikován pomocí programů TMHMM verze 2.0 a Deeploc verze 2.0.

Poslední parametr, kterému byla věnována zvýšená pozornost, byla změna míry exprese u TA proteinů. Funkcí proteinu Get1 je inserce TA proteinů do ER a odstraněním genu pro tento protein mohlo dojít ke změně v jejich expresi. TA proteiny známé u *G. intestinalis* byly hledány v proteomických datech a byla sledována míra změny jejich exprese. Bohužel, 42 % ze známých proteinů nebylo v proteomických datech knock-outové linie nalezeno. K výraznému navýšení exprese došlo pouze u jednoho TA proteinu, a to u proteinu GL50803_14047, označovaného jako Tenascin-like protein. U ostatních TA proteinů se hodnota fold change pohybovala vždy pod hodnotou 2 a ke změně v expresi došlo jen v malé míře – u 35 % proteinů byla pozorována velmi mírně zvýšená a u 23 % velmi mírně snížená exprese.

V neposlední řadě nás zajímalo, jak se projeví odstranění genu *get1* na funkci GET dráhy. V proteomických datech byly vyhledány všechny proteiny účastníci se GET dráhy. Kromě již popsaných proteinů byly do skupiny proteinů GET dráhy zahrnuty i dva proteiny, které byly objevené během experimentální práce na tomto projektu. Tyto dva proteiny jsou kandidátními proteiny EMC dráhy, která do jisté míry sdílí funkci s GET dráhou. Jedná se o GL50803_6413, popsaný jako EMC6, který je v buňkách *G. intestinalis* pravděpodobně hlavním interakčním partnerem Get1. Druhým kandidátním proteinem EMC dráhy je pak protein GL50803_15954, popsaný jako EMC1. Proteiny EMC dráhy dosud nebyly

popsány u *G. intestinalis* a chybí téměř u všech organismů patřících do skupiny Metamonada (Wideman, 2015).

Téměř u všech proteinů GET i EMC dráhy došlo ke snížení exprese, pouze u proteinů GL50803_112893 (Get4), GL50803_5069 (Bag6) a GL50803_15954 (kandidátní EMC1) došlo k mírnému zvýšení exprese (Tab. 27).

Tab. 27 – Změna poměru v množství proteinů GET dráhy v knock-outové linii. Hodnota fold change označuje změnu v poměru intenzity proteinu oproti kontrolní linii. Záporné hodnoty popisují snížení exprese (=downregulaci), kladné hodnoty popisují zvýšení exprese (=upregulaci). Do tabulky byly zahrnuty i kandidátní EMC proteiny a nově popsany kandidátní protein iniciálních kroků GET dráhy. Téměř u všech proteinů GET i EMC dráhy došlo ke slabé downregulaci. Upregulovány byly pouze proteiny Get4, Bag6 a kandidátní EMC1 (žlutě).

ID: GL50803_	Název proteinu	Fold change
14915	Get1	NaN
17616	Get2	-1,1
7953	Get3	-1,03
112893	Get4	1,12
19378	Get5	-1,19
7287	Sgt2	-1,34
5069	Bag6	1,4
15954	EMC1	1,16
6413	EMC6	-1,41

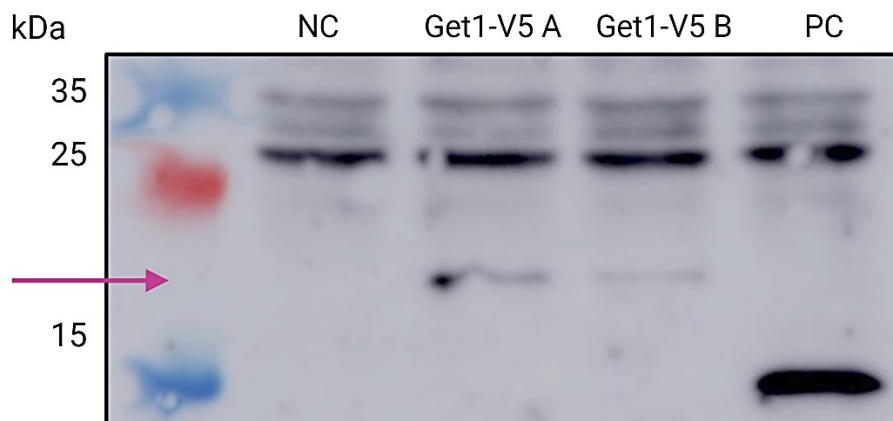
5.3. Add-back genu *get1*

5.3.1. Tvorba buněčné linie Get1-V5 in Δ Get1

K vytvoření buněčné linie pro navrácení, tzv. *add-back*, genu *get1* v buňkách *G. intestinalis* byl modifikován plazmid pUC57mini CytoBirA-V5 (Zemanová, 2019). Úsek kódující gen pro BirA byl nahrazen sekvencí kódující *get1*. V této sekvenci ale byly upraveny některé nukleotidy tak, aby Cas9 endonukleáza nacházející se v knock-outové linii Δ Get1 nemohla daný úsek vyštěpit. Vkládání těchto bodových mutací bylo provedeno tak, aby nevedlo ke změně aminokyseliny, a tudíž výsledného proteinu.

Takto vytvořený plazmid byl transfekován do knock-outové linie buněk *G. intestinalis*, ve kterých došlo k odstranění genu *get1*. Pro transfekci byly použity dvě různé koncentrace plazmidové DNA 10 μ g a 50 μ g. Po selekci blasticidinem byly vytvořeny buněčné lyzáty pro ověření exprese Get1-V5. Tyto lyzáty však nejspíše byly vytvořeny v době, kdy ještě nebyla dokončená antibiotiková selekce, neboť signál na imunoblotu byl negativní. Výše zmíněné linie byly ponechány selektovat další čtyři týdny. Pro jistotu však byla

provedena nová transfekce se zvýšeným množstvím plazmidové DNA – 100 µg. Po zhruba 5 týdnech od obou transfekcí byly vytvořeny buněné lyzáty z vybraných linií a exprese proteinu Get1-V5 byla ověřena pomocí SDS-PAGE a imunoblotu (Obr. 41). Ačkoliv signál byl velmi slabý, bylo možné potvrdit expresi Get1 v obou transfekovaných liniích.

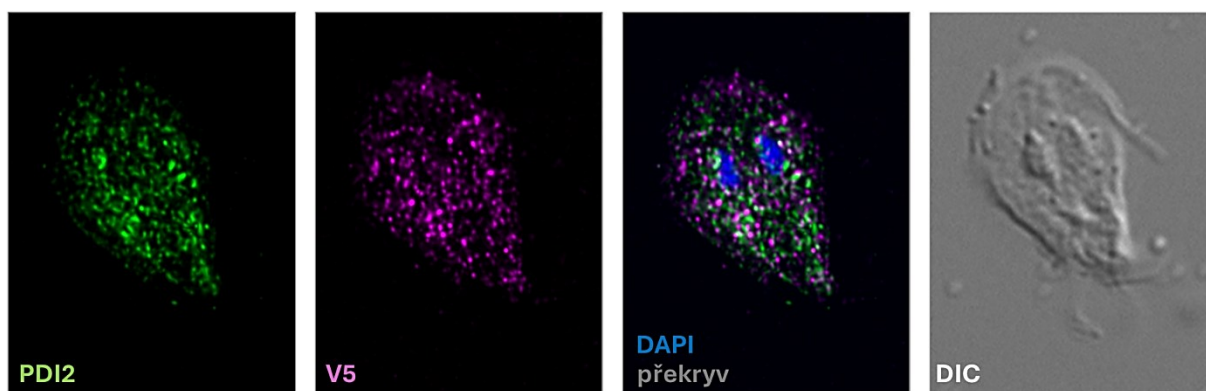


Obr. 41 – Potvrzení exprese Get1-V5 v buňkách *G. intestinalis* kmene Δ Get1. Protein byl detekován pomocí primární monoklonální králičí α -V5 protilátky a sekundární monoklonální α -králík protilátky spojené s HRP. Jako negativní kontrola (NC) byl použit lyzát z buněk kmene Δ Get1. Jako pozitivní kontrola byl použit lyzát z buněčné linie po add-backu genu *IscA-V5*. K jeho detekci byla využita stejná primární i sekundární protilátka jako v případě detekce Get1-V5. **Get1-V5 A** značí první transfekovanou linii, **Get1-V5 B** značí linii po pozdější transfekci s vyšším množstvím plazmidové DNA. Signály ve velikosti cca 22 kDa značí protein Get1-V5. Signál ve velikosti cca 15 kDa značí protein *IscA*.

5.3.2. Potvrzení navrácení fenotypu

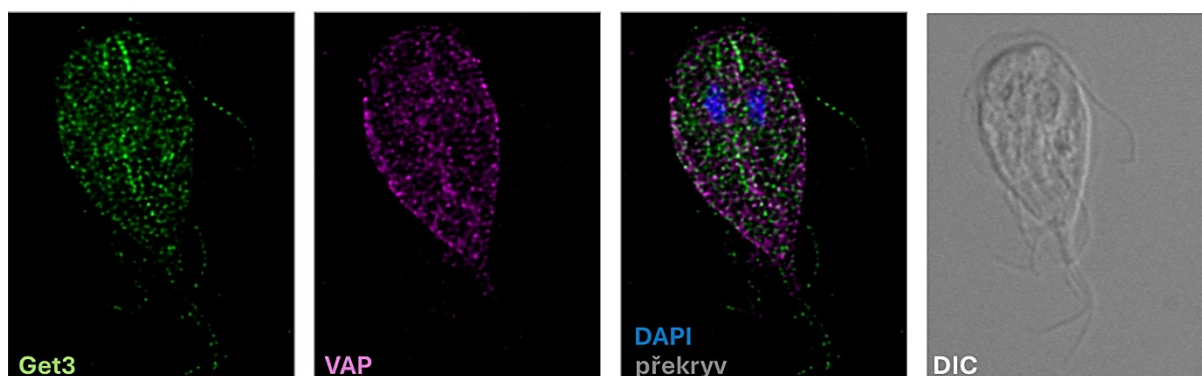
Po potvrzení exprese Get1-V5 v buňkách knock-outové linie bylo přistoupeno k ověření navrácení fenotypu, který byl ztracen kvůli odstranění *get1*. K tomu byly vytvořeny preparáty pro imunofluorescenční mikroskopii.

Prvním krokem bylo zjistit, zda byla po *add-backu* genu *get1* s V5-tagem zachována předpokládaná lokalizace tohoto proteinu (Obr. 42). Get1 je lokalizován v ER a po genovém *add-backu* by zde mělo dojít k navrácení na předpokládané místo jeho výskytu. K vizualizaci lokalizace Get1-V5 byla využita primární monoklonální králičí α -V5 protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -králík označená fluoroforem Alexa 594. Pro vizualizaci ER z důvodu případné kolokalizace s Get1-V5 byla použita primární polyklonální krysí α -PDI2 protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488. Na snímku z invertovaného konfokálního mikroskopu je zřetelná částečná kolokalizace s PDI2, což vypovídá o úspěšném navrácení genu *get1* a zachování místa výskytu tohoto proteinu.



Obr. 42 – Ověření lokalizace Get1-V5 u trofozoitů *G. intestinalis*. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou fixací. Snímky jsou výsledkem projekce maximální intenzity. K vizualizaci ER byla použita primární polyklonální krysí α -PDI2 protilátka a sekundární protilátka α -krysa označená fluoroforem Alexa 488 (zeleně). K vizualizaci Get1-V5 byla použita primární monoklonální králičí α -V5 protilátka a sekundární monoklonální protilátka α -králík označená fluoroforem Alexa 594 (tmavě růžově). Jaderná DNA je značena pomocí DAPI (modře). Snímky ve viditelném spektru byly pořízeny pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (**DIC**). Na snímku znázorňujícím překryv je patrné, že při použití protilátek α -PDI2 a α -V5 dochází k částečné kolokalizaci (bílé signály na snímku **DAPI, překryv**). Tím lze potvrdit, že *add-back* genu *get1* byl úspěšný a protein je lokalizován v ER. Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

Po ověření navrácení Get1 na předpokládané místo jeho výskytu byl vizualizován ještě endomembránový systém. Cílem bylo zjistit, zda u preparátů z linie s navráceným genem *get1* došlo ke zmizení odlišností ve fenotypu, které jsou patrné na Obr. 36. Endomembránový systém byl vizualizován stejně jako u knock-outové linie a linie WB C6 za použití protilátek α -Get3 a α -VAP (viz kap. 5.2.4.1.) (Obr. 43). S těmito dvěma liniemi byl také fenotyp linie s *add-backem* *get1* porovnáván. Ze snímků pořízených na invertovaném konfokálním mikroskopu lze vyzorovat návrat fenotypu k přirozenému stavu při značení α -Get3 protilátkou. U linie WB C6 tato protilátka značila axonemy anterolaterálních bičíků (viz Obr. 36), přičemž tento fenotyp u knock-outové linie vymizel. Při navrácení *get1* došlo k znovuobjevení tohoto fenotypu, navíc jsou značeny i axonemy ventrálních bičíků a anterolaterálních, ventrálních a kaudálních bičíků v prostoru mimo buňku. Dále byla k vizualizaci endomembránového prostoru využita protilátka α -VAP. Při použití této protilátky lze pozorovat jasný signál na periferii buňky a u axonem ventrálních bičíků, stejně jako tomu bylo u linie WB C6. U knock-outové linie axonemy ventrálních bičíků značeny nebyly, avšak tento fenotyp byl opět pozorován po genovém *add-backu*. Při použití obou zmíněných protilátek nebyla očekávaná kolokalizace, ke které také nedošlo.



Obr. 43 – Vizualizace endomembránového systému u linie s *add-backem* genu *get1* u trofozoitů *G. intestinalis*. Buňky byly fixovány metanol-acetonovou fixací a snímky jsou výsledkem projekce maximální intenzity. K vizualizaci endomembránového systému byly použity protilátky α -Get3 a α -VAP stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 5.2.4.1. Fenotyp pozorovaný u této linie byl porovnáván s fenotypy u knock-outové linie a linie WB C6 z výše zmíněné kapitoly. Při použití protilátky α -Get3 lze pozorovat navrácení signálu u axonem anterolaterálních bičíků, který byl ztracen u knock-outové linie. U linie s genovým *add-backem get1* lze také pozorovat signál značící axonemy ventrálních bičíků a také signál u axonem anterolaterálních, ventrálních a kaudálních bičíků v prostoru kolem buňky. Při použití α -VAP protilátky byl pozorován signál zejména na periferii buňky, jak tomu bylo u linií Δ Get1 a WB C6. Bylo však také pozorováno navrácení signálu u axonem ventrálních bičíků, které nebylo zaznamenáno u linie Δ Get1. Při použití těchto protilátek nebyla očekávaná kolokalizace, ke které také nedošlo. Jaderná DNA byla značena pomocí DAPI (modře). Buňky ve viditelném spektru byly vizualizovány pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (**DIC**). Snímky ukazují reprezentativní vzorek daného kmene, přičemž daný fenotyp vykazovala většina fixovaných buněk.

6. Diskuze

GET dráha umožňuje post-translační translokaci tzv. tail-anchored (TA) proteinů do membrány endoplazmatického retikula (ER). Jako první byla popsána u kvasinek, ale posléze byly komponenty této dráhy nacházeny i u mnohobuněčných organismů včetně zástupců savců a rostlin (Chartron, Clemons, et al., 2012; Jonikas et al., 2009; Schuldiner et al., 2008; Xing et al., 2017). V poslední době byly komponenty GET dráhy popsány i u parazitického prvoka *Plasmodium falciparum* (Kumar et al., 2021).

Všechny proteiny GET dráhy, včetně proteinu Bag6, který byl dříve nalezen pouze u mnohobuněčných organismů, byly také nalezeny u parazitického prvoka *G. intestinalis*. Jejich přítomnost byla potvrzena jak bioinformaticky, tak experimentálně (Najdrová, 2022). Jediný protein, jemuž u *G. intestinalis* dosud nebyla věnována dostatečná pozornost, je inzertáza Get1, zajišťující finální vložení TA proteinu do membrány ER.

Charakterizace proteinu GL50803_14915, který je homologem Get1 v buňkách *G. intestinalis*, byla hlavním tématem této diplomové práce. Cílem bylo zodpovědět si následující otázky – Nachází se Get1 skutečně v ER? Je Get1 esenciálním proteinem? Jak ovlivní odstranění genu *get1* buněčné pochody v buňkách *G. intestinalis*? Jací jsou interakční partneři Get1? Interaguje Get1 s Get2 i v tak divergovaném organismu, jako je *G. intestinalis*?

Pro všechny plánované experimenty bylo podstatné ověřit lokalizaci Get1 v *G. intestinalis*. Get1 je evolučně konzervovaný protein (Asseck et al., 2021), jenž by se u všech eukaryot měl nacházet v ER (Anghel et al., 2017). Tato lokalizace byla potvrzena i v buňkách *G. intestinalis* pomocí metod buněčné frakcionace a imunofluorescenční mikroskopie (viz kap. 5.1.2).

Pro funkční charakterizaci Get1 v *G. intestinalis* byly použity hlavní dva přístupy – metoda pull-down pro charakterizaci interakčních partnerů tohoto proteinu a následně genový knock-out pro popis potenciálních fenotypů vzniklých absencí genu *get1*.

Dosud se mělo za to, že minimální inzertázová funkční jednotka heterodimeru Get1/Get2 je vysoce konzervovaná napříč eukaryoty (McDowell et al., 2023). Naše data však ukazují, že situace u *G. intestinalis* je možná úplně jiná. Ačkoliv se buňkách tohoto parazita nacházejí oba proteiny výše zmíněného komplexu (Najdrová, 2022), naše experimenty prokázaly, že minimálně za zvolených experimentálních podmínek spolu Get1 a Get2 v buňkách *G. intestinalis* neinteragují. Naproti tomu jako nejsilnější interakční partner pro Get1 byl identifikován homolog Get2 – podjednotka EMC komplexu – EMC6 (viz kap. 5.1.4.). Samotný Get2 mezi signifikantně nabohacenými proteiny vůbec nalezen nebyl. Ze získaných dat lze usuzovat, že v buňkách *G. intestinalis* existuje inzertázový komplex Get1/EMC6 namísto očekávaného Get1/Get2. Toto velmi zajímavé zjištění by mohlo ovlivnit celkový pohled na proteiny Oxa1 superrodiny a jejich interakci během translokace TA proteinů.

U dosud studovaných eukaryot je EMC6 interakčním partnerem proteinu EMC3, který je zároveň homologem proteinu Get1 (Anghel et al., 2017). Vedle sebe tak v membráně ER existují dva systémy pro vkládání TA proteinů, jejichž dvě centrální podjednotky jsou evolučně příbuzné (spolu s TMC01 komplexem jsou tyto systémy ve skutečnosti celkem tři).

Doposud bylo známo, že jednotlivé komplexy a jejich inzertázové podjednotky se mohou v experimentální systému částečně zastupovat (Anghel et al., 2017; Güngör et al., 2022). Identifikovaná interakce Get1 a EMC6 v buňkách *G. intestinalis* ukazuje, že taková chimerická spolupráce proteinů z různých komplexů může probíhat díky unikátní evoluční adaptaci i ve zcela přirozeném systému.

Předchozí práce o evoluci EMC komplexu u eukaryot předpokládaly u anaerobních organismů úplnou absenci tohoto komplexu (Wideman, 2015). Naše identifikace podjednotky EMC6 vedla ke snaze nalézt další možné podjednotky EMC komplexu v *G. intestinalis*. Toto hledání se zdá být částečně úspěšné, neboť bioinformatickou cestou byla zřejmě nalezena podjednotka EMC1. Tato podjednotka je, stejně jako podjednotka EMC6, součástí transmembránové části EMC komplexu (Pleiner et al., 2020). Zajímavý je taktéž fakt, že jedna z domén podjednotky EMC1 sdílí jistou podobnost s EH1 helixem proteinu YidC, bakteriálního homologu Get1. Jak doména EMC1, tak EH1 helix YidC jsou umístěny v horizontální poloze těsně pod membránou (Bai et al., 2020). Jednou z hlavních funkcí podjednotky EMC1 je zprostředkování stability EMC komplexu a je možné, že stejným způsobem by mohla fungovat i u komplexu Get1/EMC6. Tato zjištění přímo vnucují myšlenku, že v *G. intestinalis* by mohl existovat inzertázový komplex Get1/EMC6/EMC1, přičemž heterodimer Get1/EMC6 by měl inzertázovou funkci a EMC1 by celý komplex stabilizoval. V proteomických datech z pull-down experimentu nebyla interakce EMC1 a Get1 nalezena. To však hypotézu o existenci komplexu Get1/EMC6/EMC1 u *G. intestinalis* nevyvrací, neboť Get1 a EMC1 spolu mohou interagovat nepřímo skrze podjednotku EMC6. Pro podporu této hypotézy by bylo vhodné provést pull-down experiment právě podjednotky EMC6, která by s EMC1 mohla interagovat.

Můžeme se však pouze domnívat, jak systém translokace TA proteinů u *G. intestinalis* vlastně funguje. Je možné, že Get1 by jakožto jediný zástupce Oxa1 superrodiny u *G. intestinalis* mohl figurovat jako promiskuitní protein, který by fungoval jako pojící článek mezi komponenty GET dráhy a podjednotkami EMC komplexu. V proteomických datech z pull-down experimentu Get1 však nebyla nalezena ani jedna komponenta GET dráhy. Přitom interakce s Get2 je klíčová pro navedení targetovacího faktoru Get3 k membráně ER a následnému předání TA proteinu, kdy Get2 tuto interakci zprostředkovává pomocí cytosolické N-terminální domény (Borgese et al., 2019). Podjednotka EMC6 a případně její další homolog, C20orf24, však touto doménou nedisponují (Anghel et al., 2017; Bai et al., 2020). Nabízí se proto otázka, jak a jestli vůbec dochází v buňkách *G. intestinalis* k interakci mezi Get1 a Get3 s navázaným TA proteinem. Lze si představit několik možných mechanismů, jak by k vložení TA proteinu do membrány mohlo dojít:

1) GET dráha v *G. intestinalis* funguje bez Get1 a konečným proteinem GET dráhy a akceptorem TA proteinu je protein Get2. Experimentální, nepublikovaná data Mgr. V. Najdové, PhD. ukazují, že Get2 a Get3 spolu vzájemně interagují. Je však otázkou, jak by došlo k vlastnímu vložení TA proteinu. Cytosolická N-terminální doména proteinu Get2 totiž nezpůsobuje konformační změnu Get3, kterou způsobuje cytosolická doména Get1 a která je důležitá pro změnu konformace Get3 ze zavřené na otevřenou za účelem uvolnění TA proteinu (Mariappan et al., 2011). Bylo však zjištěno, že Get2 se na změně konformace

Get3 do jisté míry podílí, a to díky linkeru, který propojuje N-terminální doménu pro vazbu Get3, s TMD Get2 (Chio et al., 2021). Je však otázkou, zda-li by tato struktura Get2 stačila k dostatečné změně konformace Get3 pro uvolnění TA proteinu z vazebného žlábků.

2) Get1 je v buňkách *G. intestinalis* schopen interagovat jak s Get2 proteinem, tak s podjednotkou EMC6, větší afinitu však vykazuje vůči podjednotce EMC6. S dalšími komponenty GET dráhy, tj. s proteinem Get3, by pak mohl interagovat buď při jejich zvýšené koncentraci, anebo pouze tranzientně. Proti této teorii ale stojí nepublikovaná experimentální data Mgr. V. Najdrové, PhD., podle kterých při overexpressi Get2 ani Get3 není viditelná interakce s Get1.

3) Get1 u *G. intestinalis* je i přes sekvenční homologii s Get1 ostatních eukaryot funkčně spíše EMC3 podjednotkou. U *G. intestinalis* by pak bylo možné pozorovat existenci minimalistického transmembránového regionu EMC komplexu tvořeného podjednotkami EMC3, EMC6 a EMC1. Přesný mechanismus translokace TA proteinů přes EMC komplex není znám, ví se ale, že pro přenos TA proteinu k membránovému regionu je nutná cytosolická podjednotka EMC2 (Pleiner et al., 2020). Tato podjednotka však u *G. intestinalis* nalezena nebyla. Nelze ale vyloučit, že TA protein by k transmembránovému regionu EMC komplexu nemohl doručit jiný chaperon, např. Hsp90, se kterým podjednotka EMC2 interaguje v buňkách *S. cerevisiae* (Kudze et al., 2018).

4) Translokace TA proteinů u *G. intestinalis* je zprostředkována skrze propojení komponent GET dráhy a EMC komplexu, které dohromady tvoří jeden velký translokační systém. Inzertázový komplex je tvořen heterodimerem Get1/EMC6, zatímco podjednotka EMC1 působí jako stabilizační faktor celého komplexu. Stále se ale nabízí otázka, jak by byl zprostředkován kontakt s Get3. Nelze se bránit ani domněnce, že Get2 by mohl být tranzientní součástí komplexu Get1/EMC6, který by interagoval s EMC6 a který by fungoval jako spojovací faktor mezi Get3, EMC6 a Get1 a docházelo by tak ke vzniku dynamického, tranzientního heterotrimeru Get1/EMC6/Get2, který by byl jinak běžně fungující součástí GET dráhy.

5) V buňkách *G. intestinalis* existuje komplex Get1/EMC6/EMC1 tak, jak je popsáno v bodě 4, avšak celý proces translokace je značně redukován a podobá se více translokaci pozorované u EMC komplexu. Přenosu TA proteinu k membráně ER se neúčastní Get2, Get3, ani heterotrimer Get4/Bag6/Get5, ale pouze Sgt2, který funkčně zastoupí podjednotku EMC2. Sgt2 má totiž, stejně jako EMC2, TPR doménu stejné funkce - umožňuje interakci se chaperonem s navázaným TA proteinem (Kudze et al., 2018; Liou & Wang, 2005). U TPR domén těchto dvou proteinů ale dosud nebyla pozorována žádná homologie. V případě tohoto mechanismu by Sgt2 protein spolu s co-chaperony Hsp70 a Ydj1 doručil TA protein až k membráně ER, kde by bylo jeho vložení do membrány zajištěno činností komplexu Get1/EMC6. Sgt2 by v tomto případě figuroval jak v této translokaci skrze modifikovaný EMC komplex, tak v translokaci pomocí GET dráhy, která by u *G. intestinalis* funkčně stála vedle EMC komplexu.

Ať jsou výše zmíněné teorie více či méně pravděpodobné, téměř ve všech se potýkáme s komplikovaným postavením Get2. Ačkoliv byla prokázána jeho schopnost měnit konformaci Get3, což je nutný faktor pro uvolnění TA proteinu (Chio et al., 2021), nelze s jistotou tvrdit, že přítomnost pouze Get2 by byla dostačující pro vložení TA proteinu

do membrány ER. Nakonec se nelze bránit ani domněnce, že v buňkách *G. intestinalis* je translokace TA proteinů umožněna dvěma mechanismy – pomocí GET dráhy a pomocí EMC komplexu, přičemž Get1 může hrát roli univerzální inzertázy vyskytující se v obou těchto proteinových komplexech.

Všechny zmíněné teorie jsou však pouze domněnky a bez další experimentální práce se nelze dozvědět, jak translokace TA proteinů u *G. intestinalis* skutečně funguje. Pro další pochopení tohoto procesu je nutné charakterizovat nově objevené proteiny – EMC1 i EMC6. Je důležité potvrdit jejich lokalizaci v ER a charakterizovat jejich interakční partnery. Zejména skrze charakterizaci interakčních partnerů těchto dvou podjednotek se lze dozvědět, jak probíhají finální kroky inserce TA proteinů do membrány ER u *G. intestinalis*. Zejména u podjednotky EMC1 je tato charakterizace nutná, neboť si zatím nejsme jisti, že se opravdu jedná o homolog této podjednotky v buňkách *G. intestinalis*. Nelze vyloučit, že charakterizací interakčních partnerů EMC podjednotek objevíme další podjednotky EMC komplexu. Dalším ze způsobů, jak dále prozkoumat detaily translokace TA proteinů u *G. intestinalis*, by byl knock-out genů *emc1* i *emc6* a pozorování vlivu odstranění genů kódujících tyto podjednotky na fungování buňky.

Ať už z hlediska interakce proteinu Get1 platí jakákoliv z výše zmíněných hypotéz, můžeme tvrdit, že Get1 se v *G. intestinalis* podílí na inserci proteinů do membrány ER. Pro další funkční charakterizaci Get1 v buňkách *G. intestinalis* byl proto proveden genový knock-out. Na základě faktu, že Get1 je jediným členem Oxa1 superrodiny u *G. intestinalis* jsme se domnívali, že Get1 je pro *G. intestinalis* esenciálním proteinem. V buňkách *G. intestinalis* dosud nebyl úspěšně odstraněn žádný protein GET dráhy. V naší laboratoři jsme se neúspěšně pokoušeli o odstranění Get3, což naznačilo, že funkce GET dráhy je pro buňku nenahraditelná (nepublikovaná data). To však nebylo úplně překvapivé, neboť Get3 je esenciálním proteinem u mnohobuněčných organismů (Mukhopadhyay et al., 2006), u kvasinek však absence Get3 není v laboratorních podmínkách letální (Schuldiner et al., 2008). V případě Get1 jsme podobně očekávali, že odstranění bude pro buňky letální, případně vyvolá silný růstový fenotyp.

K odstranění genu *get1* v buňkách *G. intestinalis* byl využit systém CRISPR/Cas9, který byl pro knock-out genů v buňkách tohoto prvoka úspěšně zaveden v naší laboratoři (Horáčková et al., 2022). Celkem byly vytvořeny čtyři konstrukty pro genový knock-out, které se lišily použitím různých gRNA.

Tím, že se nezávisle na sobě opakovaně podařilo vytvořit životaschopnou knock-outovou linii za použití čtyř různých gRNA, můžeme tvrdit, že Get1 není pro *G. intestinalis* esenciálním proteinem. Fenotypy způsobené odstraněním genu *get1* nejsou u *G. intestinalis* letální, stejně jako je tomu u Get1 u kvasinek, kde se absence Get1 projevila zhoršenou biogenezí peroxisomů (Onishi et al., 2018), či savců, kde odstranění Get1 vyústilo do poruchy smyslových orgánů (Sojka et al., 2014; Vogl et al., 2016). V našem případě absence Get1 výrazně neovlivnila růst knock-outové buněčné linie, která rostla srovnatelně s kontrolní linií a obě kultury byly pasážovány se stejnou frekvencí.

I přesto, že odstranění genu *get1* nebylo pro buňky *G. intestinalis* letální, domnívali jsme se, že odstranění genu *get1* mohlo vést k poškození struktury ER. Použitím α -PDI2 protilátky tedy bylo vizualizováno ER u knock-outové i wild-type linie. Ukázalo se však, že k narušení struktury ER pravděpodobně nedošlo, neboť struktury ER u knock-outové linie a linie bez modifikace genomu si byly vzájemně výrazně podobné (viz kap. 5.2.4.1.).

Úspěšně jsme však pozorovali zajímavý fenotyp při použití α -Get3 protilátky u knock-outové linie. Zde došlo ke ztrátě výrazného signálu u axonem anterolaterálních bičíků, který bylo možné pozorovat u linie bez modifikace genomu. Lze se jen dohadovat, čím tento fenotyp může být způsoben, neboť při *add-backu* genu *get1* byl tento signál při použití α -Get3 protilátky opět výrazný. Jedním z možných vysvětlení je, že vlivem odstranění Get1 došlo k nahromadění Get3 s navázanými TA proteiny, které se nemohly uvolnit do cílové membrány. Došlo tak k vysycení volného Get3 a změně jeho přirozené lokalizace.

Dalším fenotypem, který bylo možné pozorovat u buněk knock-outové linie, byla mírná změna lokalizace TA proteinu ze skupiny VAP. Je tedy pravděpodobné, že odstranění genu *get1* opravdu ovlivnilo efektivitu vkládání TA proteinů. Tento účinek absence Get1 je celkem pravděpodobný, neboť mislokalizace TA proteinů vlivem absence ortologu Get1, WRB, už byla pozorována u myši (Rivera-Monroy et al., 2016). Zajímavé však je, že exprese TA proteinů nebyla odstraněním Get1 u *G. intestinalis* v našich experimentech téměř vůbec poznamenána.

Jedním z našich předpokladů bylo, že odstranění Get1 by v buňkách *G. intestinalis* mohlo vést k narušení exportního systému, což by se projevilo na snížené schopnosti parazita tvořit infekční cystu se silnou cystovou stěnou. Mezi TA proteiny, které jsou translokovány pomocí GET dráhy, patří SNARE proteiny zajišťující fúzi membrán, skrze které je umožněn vezikulární export proteinů (Wattenberg & Lithgow, 2001). V případě odstranění Get1 by pak u *G. intestinalis* mohlo dojít k narušení biogeneze těchto TA proteinů a následnému kolapsu exportu proteinů na povrch cysty.

Ukázalo se však, že odstranění genu *get1* má na encystaci velice malý vliv. Je možné, že encystace u knock-outové linie má mírně pomalejší průběh než u linie bez modifikace genomu, neboť se ve vzorcích knock-outové linie vyskytovalo nepatrně menší množství cyst (viz kap. 5.2.4.2.). U linie bez modifikace genomu také bylo možné zachytit právě encystující buňky, což u knock-outové linie nebylo spatřeno ani na jednom preparátu. Je možné, že jedním z důvodů snížené rychlosti encystace by mohl být nedostatek proteinů zajišťujících fúzi membrán způsobený absencí Get1 a sníženým množstvím TA proteinů s touto funkcí. Aby však hypotéza o pomalejší encystaci mohla být podpořena, musela by se encystace opakovat v robustnějším množství replikátů včetně charakterizace dynamiky celého procesu.

Míra postižení komponent GET dráhy vlivem odstranění genu *get1* u *G. intestinalis* byla také předmětem našeho zájmu. Jak již bylo zmíněno, odstranění Get1 způsobuje snížení exprese Get2 u *S. cerevisiae* (F. Wang et al., 2011). K tomuto jevu došlo i v buňkách knock-outové linie, kdy došlo k velice mírnému poklesu exprese u proteinu Get2. Stejně tak ale došlo ke snížení exprese u podjednotky EMC6, přičemž pokles exprese u EMC6 byl o něco výraznější než pokles exprese u Get2.

V neposlední řadě byl genom knock-outové linie charakterizován pomocí Nanopore sekvenování. Hlavním cílem bylo ověřit vytvoření buněčné linie postrádající všechny alely *get1* a zjistit, zda využitím CRISPR/Cas9 systému nedochází k nespecifickým (off-target) úpravám genomu a identifikovat, zda došlo k vytvoření supresorových mutací. Obecným záměrem pak bylo zavést postup pro rutinní ověření tvorby genových knock-outů pro budoucí pokusy prováděné v naší laboratoři. Sekvenace genomu pomocí Nanopore sekvenování není v naší laboratoři běžně prováděným experimentem, a proto bylo provedeno v laboratoři našich spolupracovníků na Uppsala Universitet. Ukázalo se, že tento postup je vhodný pro ověřování odstranění genu.

Specifická mutace pro knock-outovou linii byla nalezena pouze jedna, a to v genu, který se stejně jako *get1* nachází na čtvrtém chromozomu a kóduje protein s označením GL50803_0024111. Jedná se o substituční mutaci, při které došlo k nahrazení jediného nukleotidu a která vedla k aminokyselinové záměně. Výše zmíněný gen kóduje protein s metyltransferázovou aktivitou interagující s C-terminální doménou RNA polymerázy II. Na základě dostupných informací se však pravděpodobně nejedná o specifickou odpověď na absenci Get1 v buňkách *G. intestinalis*.

Závěrem lze říci, že provedené experimenty a bioinformatické analýzy prezentované v této diplomové práci přinesly řadu nových a zajímavých informací o funkci a evoluci proteinu Get1. Naším záměrem je v blízké budoucnosti provést navazující studie, které nám pomohou (i) charakterizovat vlastnosti identifikovaného unikátního chimerického komplexu obsahujícího podjednotky GET dráhy a EMC komplexu, (ii) objasnit finální krok vkládání TA proteinů pomocí GET dráhy a (iii) stanovit význam biogeneze TA proteinů pro životní cyklus *G. intestinalis*.

7. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci homologu proteinu Get1 u *G. intestinalis*. K charakterizaci tohoto proteinu bylo přistoupeno skrze dva hlavní přístupy – identifikaci interakčních partnerů skrze pull-down experiment a knock-out genu *get1*.

Metodou pull-down jsme byli schopni identifikovat hlavního interakčního partnera Get1, kterým však překvapivě nebyl Get2, jako je tomu u ostatních organismů. Dospěli jsme k překvapivému zjištění, že hlavním interakčním partnerem Get1 je pravděpodobně podjednotka EMC6, homolog proteinu Get2. Identifikace EMC6 u *G. intestinalis* je o to zajímavější, že žádná podjednotka EMC komplexu dosud nebyla u tohoto prvoka a ani u jiného zástupce skupiny Metamonada nalezena. Při snaze nalézt další podjednotky EMC komplexu jsme pomocí bioinformatické analýzy identifikovali další komponentu EMC komplexu, a to membránovou podjednotku EMC1. Funkce této podjednotky u *G. intestinalis* však není jasná a bude také nutné experimentálně potvrdit její přítomnost. Dále bude potřeba funkčně charakterizovat obě nalezené podjednotky i s jejich interakčními partnery skrze pull-down experiment.

Za použití CRISPR/Cas9 metody zavedené pro *G. intestinalis* jsme byli schopni úspěšně vytvořit knock-outové linie postrádající *get1*. Ukázalo se, že odstranění genu *get1* není pro *G. intestinalis* letální a že fenotyp způsobený odstraněním tohoto genu má za experimentálních podmínek pouze mírné projevy, jako je změna v lokalizaci Get3.

Provedli jsme také pilotní sekvenování genomu knock-outové linie pomocí Nanopore sekvenování, které bylo vhodné pro potvrzení odstranění genu.

Úspěšně jsme také vytvořili konstrukt *get1* s modifikovanými kodony, který umožnil navrácení tohoto genu do knock-outové linie. Ukázalo se, že po navrácení genu došlo k obnovení fenotypu, který bylo možné pozorovat u linie bez modifikace genomu.

Díky všem získaným datům se nám povedlo identifikovat unikátní vlastnosti GET dráhy, které nebyly dosud identifikovány u jiných eukaryot. Tyto objevy otevírají dveře mnoha dalším otázkám ohledně mechanismu translokace TA proteinů nejen u *G. intestinalis*.

8. Seznam použitých zkratek

ADP	Adenosindifosfát
AK	Aminokyselina
AMP	Ampicilin
ATP	Adenosintrifosfát
Bag6	Bcl2-associated athanogene 6
BAP tag	Biotin acceptor peptid tag
Bat3	HLA-B associated transkript 3
BirA	Biotin ligáza
BLAST	Blasticidin
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)
CAML	Calcium modulating cyclophilin ligand
cDNA	Komplementární DNA (complementary DNA)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CWP	Cyst-wall protein
DIC	Diferenciální interferenční kontrast
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxynukleotidy
DPT	N,N-dipropyltryptamin
DSP	Dithio(sukcinimidyl)propionát
DTT	Dithiotreitol
DUF 106	Domain of unknown function 106
EDTA	Etylendiaminotetraoctová kyselina
EGTA	Etylenglykol-di-(2-aminoteyleter) tetraoctová kyselina
EMC	Endoplasmic reticulum Membrane protein Complex
ER	Endoplazmatické retikulum
ERAD	ER-asociovaná degradace
FDR	False Discovery Rate
Fwd	Forward primer
G418	Geneticin
G6PI	Glukóza-6-fosfát-izomeráza
GA	Golgiho aparát
GDH	Glutamátdehydrogenáza
gDNA	Genomová DNA
GET dráha	Guided Entry of Tail-anchored proteins
gRNA	Guide RNA
HCD	Kolizní disociace s vyšší energií
HIV	Virus lidské imunodeficiency (Human immunodeficiency virus)
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMW	Vysokohmotnostní DNA (High molecular weight DNA)
HRP	Křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase)
Hsc82	Heat shock cognate protein 82

HSP	High-speed pellet
Hsp70	Heat shock protein 70
IBS	Syndrom dráždivého tračníku (Irritable Bowel Syndrom)
IMCF	Servisní laboratoř zobrazovací techniky
JDP	J-domain protein
kbp	Kilopár bází
LECA	Poslední společný eukaryotický předek (Last Eukaryotic Common Ancestor)
LEU	Leupeptin
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Main histocompatibility complex)
MMTS	Metyl-metanthiosulfonát
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MoRF	Molecular recognition features
NC	Negativní kontrola
NK buňky	Natural-killer buňky
NLS	Jaderný lokalizační signál (Nuclear Localisation Signal)
OPTI	Obligate partner of TMCO insertase
PAC	Puromycin-N-acetyltransferáza
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PDI2	Protein disulfidisomeráza 2
PIPES	Piperazin-N,N-bis(2-etan)sulfonová kyselina
pLDDT	Predicted local distance difference test
PT	Pokožová teplota
PUR	Puromycin
PV	Periferní vakuoly
Rev	Reverse primer
RNA	Ribonukleová kyselina
SAR	Superskupina Stramenopila, Alveolata, Rhizaria
SDC	Deoxycholát sodný
SDS	Dodecyl-síran sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
Sgt2	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2
SGTA	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein A
SNARE	Soluble N-ethylmale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors
SND	SRP-independent protein
SOC	Super optimal broth
SP3	Signle-pot, solid-phase-enhanced sample preparation
SRP	Signál rozpoznávající částice (Signal Recognition Particle)
TA	Tail-anchored (proteiny)
TCEP	Tris(2-karboxyetyl)fosfin
TEAB	Hydrogenuhlčitan tryetylamonný
TFA	Trifluoroctová kyselina
TGS	Tris-Glycin-SDS
TLCK	N- α -tosyl-L-lysin-chlormetylketon

TMCO1	Transmembrane and coiled-coil domains 1
TMD	Transmembránová doména
TOC	Translokáza vnější membrány chloroplastů
TOM	Translokáza vnější mitochondriální membrány
TPR	Tetratricopeptidová doména
TRC dráha	Transmembrane domain Recognition Complex
TRC35	Transmembrane recognition complex of 35 kDa
TRC40	Transmembrane recognition complex of 40 kDa
UBL	Ubiquitin-like doména
Ubl4A	Ubiquitin-like protein 4A
UTR	Nepřekládaná oblast mRNA (untranslated region)
VAMP	Vesicle-associated membrane proteins
VAP	VAMP-associated proteins
VSP	Variant-specific Surface Protein
WB c6	Izolát <i>G. intestinalis</i> (klon 6)
WRB	Tryptophan-rich basic protein
Ylp1	YidC-like protein 1

9. Seznam použité literatury

- Abodeely, M., Dubois, K. N., Hehl, A., Stefanie, S., Sajid, M., Desouza, W., Attias, M., Engel, J. C., Hsieh, I., Fetter, R. D., & McKerrow, J. H. (2009). A contiguous compartment functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia lamblia*. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1665–1676.
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*.
- Akahane, T., Sahara, K., Yashiroda, H., Tanaka, K., & Murata, S. (2013). Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly. *Nature Communications*, 4, 1–8.
- Ali, D., Abbady, A. Q., Kweider, M., & Soukkarieh, C. (2016). Cloning, expression, purification and characterization of *Leishmania tropica* PDI-2 protein. *Open Life Sciences*, 11(1), 166–176.
- Alvarez-Jarreta, J., Amos, B., Aurrecochea, C., Bah, S., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E. Y., Belnap, R., Blevins, A., Böhme, U., Brestelli, J., Brown, S., Callan, D., Campbell, L. I., Christophides, G. K., Crouch, K., Davison, H. R., DeBarry, J. D., Demko, R., Zheng, J. (2024). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center in 2023. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D808–D816.
- Angeletti, P. C., Walker, D., & Panganiban, A. T. (2002). Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell Stress and Chaperones*, 7(3), 258–268.
- Anghel, S. A., McGilvray, P. T., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Identification of Oxal Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports*, 21(13), 3708–3716.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413–422.
- Asseck, L. Y., Mehlhorn, D. G., Monroy, J. R., Ricardi, M. M., Breuninger, H., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W., Nowrousian, M., Xing, S., Schwappach, B., Bayer, M., & Grefen, C. (2021). Endoplasmic reticulum membrane receptors of the GET pathway are conserved throughout eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(1).
- Aviram, N., Ast, T., Costa, E. A., Arakel, E. C., Chuartzman, S. G., Jan, C. H., Haßdenteufel, S., Dudek, J., Jung, M., Schorr, S., Zimmermann, R., Schwappach, B., Weissman, J. S., & Schuldiner, M. (2016). The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Nature*, 540(7631), 134–138.
- Bai, L., You, Q., Feng, X., Kovach, A., & Li, H. (2020). Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*, 584(7821), 475–478.
- Banerji, J., Sands, J., Strominger, J. L., & Spies, T. (1990). A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 87(6), 2374–2378.

- Battle, A., Jonikas, M. C., Walter, P., Weissman, J. S., & Koller, D. (2010). Automated identification of pathways from quantitative genetic interaction data. *Molecular Systems Biology*, 6(379), 1–13.
- Bernander, R., Palm, J. E. D., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), 55–62.
- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A., & Elofsson, A. (2009). TOPCONS: Consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2).
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.
- Binici, J., & Koch, J. (2014). BAG-6, a jack of all trades in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(10), 1829–1837.
- Bircham, P. W., Maass, D. R., Roberts, C. A., Kiew, P. Y., Low, Y. S., Yegambaram, M., Matthews, J., Jack, C. A., & Atkinson, P. H. (2011). Secretory pathway genes assessed by high-throughput microscopy and synthetic genetic array analysis. *Molecular BioSystems*, 7(9), 2589–2598. <https://doi.org/10.1039/c1mb05175j>
- Borgese, N., Colombo, S., & Pedrazzini, E. (2003). The tale of tail-anchored proteins: Coming from the cytosol and looking for a membrane. *Journal of Cell Biology*, 161(6), 1013–1019.
- Borgese, N., Coy-Vergara, J., Colombo, S. F., & Schwappach, B. (2019). The ways of tails: the GET Pathway and more. *Protein Journal*, 38(3), 289–305.
- Borgese, N., & Fasana, E. (2011). Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(3), 937–946.
- Borowska, M. T., Dominik, P. K., Anghel, S. A., Kosiakoff, A. A., & Keenan, R. J. (2015). A YidC-like protein in the archaeal plasma membrane. *Structure*, 23(9), 1715–1724.
- Bozkurt, G., Stjepanovic, G., Vilardi, F., Amlacher, S., Wild, K., Bange, G., Favaloro, V., Rippe, K., Hurt, E., Dobberstein, B., & Sinning, I. (2009). Structural insights into tail-anchored protein binding and membrane insertion by Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21131–21136.
- Bozkurt, G., Wild, K., Amlacher, S., Hurt, E., Dobberstein, B., & Sinning, I. (2010). The structure of Get4 reveals an α -solenoid fold adapted for multiple interactions in tail-anchored protein biogenesis. *FEBS Letters*, 584(8), 1509–1514.
- Brožová, K., Jirků, M., Lhotská, Z., Květoňová, D., Kadlecová, O., Stensvold, C. R., Samaš, P., Petrželková, K. J., & Jirků, K. (2023). The opportunistic protist, *Giardia intestinalis*, occurs in gut-healthy humans in a high-income country. *Emerging Microbes and Infections*, 12(2).
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W., & Simpson, A. G. B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 35(1), 43–55.
- Caglayan, A., Per, H., Akgumus, G., Gumus, H., Baranoski, J., Canpolat, M., Calik, M., Yikilmaz, A., Bilguvar, K., Kumandas, S., & Gunel, M. (2013). Whole-exome sequencing identified a patient with TMC01 defect syndrome and expands the phenotypic spectrum. *Clinical Genetics*, 84(4), 394–395.

- Carpenter, M. L., & Cande, W. Z. (2009). Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*, 8(6), 916–919.
- Casson, J., McKenna, M., Haßdenteufel, S., Aviram, N., Zimmerman, R., & High, S. (2017). Multiple pathways facilitate the biogenesis of mammalian tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science*, 130(22), 3851–3861.
- Castillo-Romero, A., Davids, B. J., Lauwaet, T., & Gillin, F. D. (2012). Importance of enolase in *Giardia lamblia* differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 184(2), 122–125.
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 14(9), 1–5.
- Chang, Y. W., Chuang, Y. C., Ho, Y. C., Cheng, M. Y., Sun, Y. J., Hsiao, C. D., & Wang, C. (2010). Crystal structure of Get4-Get5 complex and its interactions with Sgt2, Get3, and Ydj1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9962–9970.
- Chang, Y. W., Lin, T. W., Li, Y. C., Huang, Y. S., Sun, Y. J., & Hsiao, C. D. (2012). Interaction surface and topology of Get3-Get4-Get5 protein complex, involved in targeting tail-anchored proteins to endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4783–4789.
- Chartron, J. W., Clemons, W. M., & Suloway, C. J. M. (2012). The complex process of GETting tail-anchored membrane proteins to the ER. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(2), 217–224.
- Chartron, J. W., Gonzalez, G. M., & Clemons, W. M. (2011). A structural model of the Sgt2 protein and its interactions with chaperones and the Get4/Get5 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286(39), 34325–34334.
- Chartron, J. W., Suloway, C. J. M., Zaslaver, M., & Clemons, W. M. (2010). Structural characterization of the Get4/Get5 complex and its interaction with Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12127–12132.
- Chartron, J. W., VanderVelde, D. G., & Clemons, W. M. (2012). Structures of the Sgt2/SGTA dimerization domain with the Get5/UBL4A UBL domain reveal an interaction that forms a conserved dynamic interface. *Cell Reports*, 2(6), 1620–1632.
- Chartron, J. W., VanderVelde, D. G., Rao, M., & Clemons, W. M. (2012). Get5 carboxyl-terminal domain is a novel dimerization motif that tethers an extended Get4/Get5 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8310–8317.
- Chen, C. M., Misra, T. K., Silver, S., & Rosen, B. P. (1986). Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15030–15038.
- Chen, H., Li, L., Hu, J., Zhao, Z., Ji, L., Cheng, C., Zhang, G., Zhang, T., Li, Y., Chen, H., Pan, S., & Sun, B. (2019). UBL4A inhibits autophagy-mediated proliferation and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma via targeting LAMP1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–18.
- Chen, Z., Mondal, A., Abderemane-Ali, F., Jang, S., Niranjana, S., Montañó, J. L., Zaro, B. W., & Minor, D. L. (2023). EMC chaperone–CaV structure reveals an ion channel assembly intermediate. *Nature*, 619(7969), 410–419.

- Chio, U. S., Chung, S. Y., Weiss, S., & Shan, S. O. (2019). A chaperone lid ensures efficient and privileged client transfer during tail-anchored protein targeting. *Cell Reports*, *26*(1), 37-44.e7.
- Chio, U. S., Liu, Y., Chung, S., Shim, W. J., Chandrasekar, S., Weiss, S., & Shan, S. O. (2021). Subunit cooperation in the get1/2 receptor promotes tail-anchored membrane protein insertion. *Journal of Cell Biology*, *220*(11).
- Chiou, C. S., Chen, B. H., Wang, Y. W., Kuo, N. T., Chang, C. H., & Huang, Y. T. (2023). Correcting modification-mediated errors in nanopore sequencing by nucleotide demodification and reference-based correction. *Communications Biology*, *6*(1), 1–9.
- Chitwood, P. J., Juszkiwicz, S., Guna, A., Shao, S., & Hegde, R. S. (2018). EMC is required to initiate accurate membrane protein topogenesis. *Cell*, *175*(6), 1507-1519.
- Cho, H., Liu, Y., Chung, S. Y., Chandrasekar, S., Weiss, S., & Shan, S. O. (2024). Dynamic stability of Sgt2 enables selective and privileged client handover in a chaperone triad. *Nature Communications*, *15*(1).
- Cho, H., & Shan, S. (2018). Substrate relay in an Hsp70-cochaperone cascade safeguards tail-anchored membrane protein targeting. *The EMBO Journal*, *37*(16), 1–17.
- Cho, H., Shim, W. J., Liu, Y., & Shan, S. O. (2021). J-domain proteins promote client relay from Hsp70 during tail-anchored membrane protein targeting. *Journal of Biological Chemistry*, *296*(25), 100546.
- Christianson, J. C., Olzmann, J. A., Shaler, T. A., Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Wade Harper, J., & Kopito, R. R. (2012). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nature Cell Biology*, *14*(1), 93–105.
- Costello, J. L., Castro, I. G., Camões, F., Schrader, T. A., McNeall, D., Yang, J., Giannopoulou, E. A., Gomes, S., Pogenberg, V., Bonekamp, N. A., Ribeiro, D., Wilmanns, M., Jedd, G., Islinger, M., & Schrader, M. (2017). Predicting the targeting of tail-anchored proteins to subcellular compartments in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, *130*(9), 1675–1687.
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, *26*(12), 1367–1372.
- Dacks, J. B., Marinets, A., Doolittle, W. F., Cavalier-Smith, T., & Logsdon, J. M. (2002). Analyses of RNA polymerase II genes from free-living protists: Phylogeny, long branch attraction, and the eukaryotic big bang. *Molecular Biology and Evolution*, *19*(6), 830–840.
- Darby, J. F., Krysztofinska, E. M., Simpson, P. J., Simon, A. C., Leznicki, P., Sriskandarajah, N., Bishop, D. S., Hale, L. R., Alfano, C., Conte, M. R., Martínez-Lumbreras, S., Thapaliya, A., High, S., & Isaacson, R. L. (2014). Solution structure of the SGTA dimerisation domain and investigation of its interactions with the ubiquitin-like domains of BAG6 and UBL4A. *PLoS ONE*, *9*(11), 1–19.
- Denic, V. (2012). A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(10), 411–417.
- Denic, V., Dötsch, V., & Sinning, I. (2013). Endoplasmic reticulum targeting and insertion of

- tail-anchored membrane proteins by the GET pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8).
- Deshaies, R. J., & Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 105(2), 633–645.
- Diamantopoulou, A., Sun, Z., Mukai, J., Xu, B., Fenelon, K., Karayiorgou, M., & Gogos, J. A. (2017). Loss-of-function mutation in *Mirta22/Emc10* rescues specific schizophrenia-related phenotypes in a mouse model of the 22q11.2 deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30), 6127–6136.
- Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., & Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 847–853.
- Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubáčová, Z., Bursać, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T., & Tachezy, J. (2005). *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10924–10929.
- Ebneter, J. A., Heusser, S. D., Schraner, E. M., Hehl, A. B., & Faso, C. (2016). Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. *Nature Communications*, 7, 1–10.
- Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M. P., Grabherr, M., Ribacke, U., & Svärd, S. G. (2016). Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–22.
- Elgersma, Y., Kwast, L., Van Den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S., & Tabak, H. F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO Journal*, 16(24), 7326–7341.
- Elias, E. V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T. E., Neiman, A., & Lujan, H. D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35996–36010.
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C., & McCaffery, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 33(1), 3–28.
- Embley, T. M., & Hirt, R. P. (1998). Early branching eukaryotes? *Current Opinion in Genetics and Development*, 8(6), 624–629.
- Faso, C., & Hehl, A. B. (2011). Membrane trafficking and organelle biogenesis in *Giardia lamblia*: Use it or lose it. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 471–480.
- Favaloro, V., Vilardi, F., Schlecht, R., Mayer, M. P., & Dobberstein, B. (2010). Asn1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science*, 123(9), 1522–1530.
- Fernandes, J. M. O., Macqueen, D. J., Lee, H. T., & Johnston, I. A. (2008). Genomic, evolutionary, and expression analyses of *cee*, an ancient gene involved in normal growth and development. *Genomics*, 91(4), 315–325.

- Fry, M. Y., Najdřová, V., Maggiolo, A. O., Saladi, S. M., Doleřal, P., & Clemons, W. M. (2022). Structurally derived universal mechanism for the catalytic cycle of the tail-anchored targeting factor Get3. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(8), 820–830.
- Ganapathiraju, M., Jursa, C. J., Karimi, H. A., & Klein-Seetharaman, J. (2007). TMpro web server and web service: Transmembrane helix prediction through amino acid property analysis. *Bioinformatics*, 23(20), 2795–2796.
- Gillin, F. D., Boucher, S. E., Rossi, S. S., & Reiner, D. S. (1989). *Giardia lamblia*: The roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Experimental Parasitology*, 69(1), 164–174.
- Goedhart, J., & Luijsterburg, M. S. (2020). VolcaNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, 10(1), 1–5.
- Gristick, H. B., Rao, M., Chartron, J. W., Rome, M. E., Shan, S. O., & Clemons, W. M. (2014). Crystal structure of ATP-bound Get3-Get4-Get5 complex reveals regulation of Get3 by Get4. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(5), 437–442.
- Gristick, H. B., Rome, M. E., Chartron, J. W., Rao, M., Hess, S., Shan, S. O., & Clemons, W. M. (2015). Mechanism of assembly of a substrate transfer complex during tail-anchored protein targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 30006–30017.
- Guna, A., Volkmar, N., Christianson, J. C., & Hegde, R. S. (2018). The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science*, 359(6374), 470–473.
- Güngör, B., Flohr, T., Garg, S. G., & Herrmann, J. M. (2022). The ER membrane complex (EMC) can functionally replace the Oxa1 insertase in mitochondria. *PLoS Biology*, 20(3), 1–18.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Hanevik, K., Dizdar, V., Langeland, N., & Hausken, T. (2009). Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterology*, 9, 1–5.
- Hanevik, K., Wensaas, K. A., Rortveit, G., Eide, G. E., Mørch, K., & Langeland, N. (2014). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after *Giardia* infection: A controlled prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 59(10), 1394–1400.
- Haßdenteufel, S., Sicking, M., Schorr, S., Aviram, N., Fecher-Trost, C., Schuldiner, M., Jung, M., Zimmermann, R., & Lang, S. (2017). hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells. *FEBS Letters*, 591(20), 3211–3224.
- Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2022). The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 107–124). Nature Research.
- Hennon, S. W., Soman, R., Zhu, L., & Dalbey, R. E. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 family of insertases. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14866–14874.
- Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H. D., Gutierrez, E., & Hegde, R. S. (2011). Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature*, 475(7356), 394–399.
- Holberton, D. V. (1973). Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of

- attachment in the flagellate *Giardia muris*. *Journal of Cell Science*, 13(1), 11–41.
- Horáčková, V., Voleman, L., Hagen, K. D., Petru, M., Vinopalová, M., Weisz, F., Janowicz, N., Marková, L., Motycková, A., Najdová, V., Tumová, P., Dawson, S. C., & Doležal, P. (2022). Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene disruption in the tetraploid protist *Giardia intestinalis*. *Open Biology*, 12(4).
- Hu, Z., Potthoff, B., Hollenberg, C. P., & Ramezani-Rad, M. (2006). Mdy2, a ubiquitin-like (UBL)-domain protein, is required for efficient mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 119(2), 326–338.
- Ish-Horowicz, M., Korman, S. H., Shapiro, M., Har-Even, U., Tamir, I., Strauss, N., & Deckelbaum, R. J. (1989). Asymptomatic giardiasis in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 8(11), 773–779.
- Jedelský, P. L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A. J., Beltrán, N. C., Lithgow, T., & Tachezy, J. (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE*, 6(2), 15–21.
- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S., & Schuldiner, M. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 323(March), 1693–1697.
- Kabbage, M., & Dickman, M. B. (2008). The BAG proteins: A ubiquitous family of chaperone regulators. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(9), 1390–1402.
- Kalbfleisch, T., Cambon, A., & Wattenberg, B. W. (2007). A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic*, 8(12), 1687–1694.
- Kämper, N., Franken, S., Temme, S., Koch, S., Bieber, T., & Koch, N. (2012). 7-Interferon-regulated chaperone governs human lymphocyte antigen class II expression. *The FASEB Journal*, 26(1), 104–116.
- Kawata, K., Baba, A., Shiota, M., Wanibuchi, H., & Baba, Y. (2021). ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca²⁺ entry. *The Journal of Biochemistry*, 170(4), 483–488.
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 755–775.
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 487–488.
- Kohl, C., Tessarza, P., Malsburg, K. Von Der, Zahn, R., Bukau, B., & Mogk, A. (2011). Cooperative and independent activities of Sgt2 and Get5 in the targeting of tail-anchored proteins. *Biological Chemistry*, 392(7), 601–608.
- Koike, K., Masuda, T., Sato, K., Fujii, A., Wakiyama, H., Tobo, T., Takahashi, J., Motomura, Y., Nakano, T., Saito, H., Matsumoto, Y., Otsu, H., Takeishi, K., Yonemura, Y., Mimori, K., & Nakagawa, T. (2022). GET4 is a novel driver gene in colorectal cancer that regulates the localization of BAG6, a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Cancer Science*, 113(1), 156–169.

- Kors, S., Costello, J. L., & Schrader, M. (2022). VAP Proteins – From Organelle Tethers to Pathogenic Host Interactors and Their Role in Neuronal Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10(June).
- Krenciute, G., Liu, S., Yucer, N., Shi, Y., Ortiz, P., Liu, Q., Kim, B. J., Odejimi, A. O., Leng, M., Qin, J., & Wang, Y. (2013). Nuclear BAG6-UBL4A-GET4 complex mediates DNA damage signaling and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20547–20557.
- Krysztofinska, E. M., Evans, N. J., Thapaliya, A., Murray, J. W., Morgan, R. M. L., Martinez-Lumbreras, S., & Isaacson, R. L. (2017). Structure and interactions of the TPR domain of Sgt2 with yeast chaperones and Ybr137wp. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(OCT), 1–11.
- Kubota, K., Yamagata, A., Sato, Y., Goto-Ito, S., & Fukai, S. (2012). Get1 stabilizes an open dimer conformation of Get3 ATPase by binding two distinct interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 422(3), 366–375.
- Kudze, T., Mendez-Dorantes, C., Jalloh, C. S., & McClellan, A. J. (2018). Evidence for interaction between Hsp90 and the ER membrane complex. *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 1101–1115.
- Kumar, T., Maitra, S., Rahman, A., & Bhattacharjee, S. (2021). A conserved guided entry of tail-anchored pathway is involved in the trafficking of a subset of membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. In *PLoS Pathogens* (Vol. 17, Issue 11).
- Kutay, U., Hartmann, E., & Rapoport, T. A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends in Cell Biology*, 3(3), 72–75.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734.
- Lahiri, S., Chao, J. T., Tavassoli, S., Wong, A. K. O., Choudhary, V., Young, B. P., Loewen, C. J. R., & Prinz, W. A. (2014). A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biology*, 12(10).
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., De Carvalho, T. M. U., Kattenbach, W. M., & De Souza, W. (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *Journal of Structural Biology*, 123(3), 225–235.
- Lee, K., Ziegelhoffer, T., Delewski, W., Berger, S. E., Sabat, G., & Craig, E. A. (2021). Pathway of Hsp70 interactions at the ribosome. *Nature Communications*, 12(1), 1–10.
- Lei, P., Xiao, Y., Li, P., Xie, P., Wang, H., Huang, S., Song, P., & Zhao, Y. (2020). hSnd2/TMEM208 is an HIF-1 α -targeted gene and contains a WH2 motif. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 52(3), 328–331.
- Leznicki, P., Clancy, A., Schwappach, B., & High, S. (2010). Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science*, 123(13), 2170–2178.
- Li, M., Khambu, B., Zhang, H., Kang, J. H., Chen, X., Chen, D., Vollmer, L., Liu, P. Q., Vogt, A., & Yin, X. M. (2013). Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35769–35780.

- Liaci, A. M., & Förster, F. (2021). Take me home, protein roads: Structural insights into signal peptide interactions during ER translocation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21).
- Lin, K. F., Fry, M. Y., Saladi, S. M., & Clemons, W. M. (2021). Molecular basis of tail-anchored integral membrane protein recognition by the cochaperone Sgt2. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100441.
- Lin, Z. Q., Gan, S. W., Tung, S. Y., Ho, C. C., Su, L. H., & Sun, C. H. (2019). Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption systems in *Giardia lamblia*. *PLoS ONE*, *14*(3), 1–30.
- Liou, S. T., Cheng, M. Y., & Wang, C. (2007). SGT2 and MDY2 interact with molecular chaperone YDJ1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress and Chaperones*, *12*(1), 59–70.
- Liou, S. T., & Wang, C. (2005). Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *435*(2), 253–263.
- Liu, L., Mao, S., Chen, K., Dai, J., Jin, S., Chen, L., Wang, Y., Guo, L., Yang, Y., Zhan, C., Xiong, Z., Diao, H., Zhou, Y., Ding, Q., & Wang, X. (2022). Membrane-bound EMC10 is required for sperm motility via maintaining the homeostasis of cytoplasm sodium in sperm. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17).
- Manilal, S., Nguyen, T. M., Sewry, C. A., & Morris, G. E. (1996). The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Human Molecular Genetics*, *5*(6), 801–808.
- Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R. J., & Hegde, R. S. (2010). A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature*, *466*(7310), 1120–1124.
- Mariappan, M., Mateja, A., Dobosz, M., Bove, E., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2011). The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature*, *477*(7362), 61–69.
- Marquez, J., Aslam, F., & Khokha, M. K. (2023). Expanding EMC foldopathies: Topogenesis deficits alter the neural crest. *Genesis (United States)*, *61*(5).
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolísko, M., Tachezy, J., & Doležal, P. (2015). Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using *in vivo* enzymatic tagging. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(16), 2864–2874.
- Mateja, A., & Keenan, R. J. (2018). A structural perspective on tail-anchored protein biogenesis by the GET pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, *51*, 195–202.
- Mateja, A., Szlachcic, A., Downing, M. E., Dobosz, M., Mariappan, M., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2009). The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature*, *461*(7262), 361–366.
- Matsumoto, S., Ono, S., Shinoda, S., Kakuta, C., Okada, S., Ito, T., Numata, T., & Endo, T. (2022). GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. *Journal of Cell Biology*, *221*(6).
- McDowell, M. A., Heimes, M., Enkavi, G., Farkas, Á., Saar, D., Wild, K., Schwappach, B.,

- Vattulainen, I., & Sinning, I. (2023). The GET insertase exhibits conformational plasticity and induces membrane thinning. *Nature Communications*, *14*(1), 1–16.
- McDowell, M. A., Heimes, M., Fiorentino, F., Mehmood, S., Farkas, Á., Coy-Vergara, J., Wu, D., Bolla, J. R., Schmid, V., Heinze, R., Wild, K., Flemming, D., Pfeffer, S., Schwappach, B., Robinson, C. V., & Sinning, I. (2020). Structural basis of tail-anchored membrane protein biogenesis by the GET insertase complex. *Molecular Cell*, *80*(1), 72–86.
- McDowell, M. A., Heimes, M., & Sinning, I. (2021). Structural and molecular mechanisms for membrane protein biogenesis by the Oxal superfamily. *Nature Structural and Molecular Biology*, *28*(3), 234–239.
- McGilvray, P. T., Anghel, S. A., Sundaram, A., Zhong, F., Trnka, M. J., Fuller, J. R., Hu, H., Burlingame, A. L., & Keenan, R. J. (2020). An ER translocon for multi-pass membrane protein biogenesis. *ELife*, *9*, 1–43.
- McInally, S. G., Hagen, K. D., Nosala, C., Williams, J., Nguyen, K., Booker, J., Jones, K., & Dawson, S. C. (2019). Robust and stable transcriptional repression in *Giardia* using CRISPRi. *Molecular Biology of the Cell*, *30*(1), 119–130.
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, *32*(11), 1–13.
- Meng, T. C., Aley, S. B., Svard, S. G., Smith, M. W., Huang, B., Kim, J., & Gillin, F. D. (1996). Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *79*(1), 103–108.
- Miller-Vedam, L. E., Bräuning, B., Popova, K. D., Oakdale, N. T. S., Bonnar, J. L., Prabu, J. R., Boydston, E. A., Sevillano, N., Shurtleff, M. J., Stroud, R. M., Craik, C. S., Schulman, B. A., Frost, A., & Weissman, J. S. (2020). Structural and mechanistic basis of the EMC-dependent biogenesis of distinct transmembrane clients. *ELife*, *9*, 1–124.
- Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H., & Kawahara, H. (2010). BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *Journal of Cell Biology*, *190*(4), 637–650.
- Mock, J. Y., Chartron, J. W., Zaslaver, M., Xu, Y., Ye, Y., & Clemons, W. M. (2015). Bag6 complex contains a minimal tail-anchor-targeting module and a mock BAG domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(1), 106–111.
- Mock, J. Y., Xu, Y., Ye, Y., & Clemons, W. M. (2017). Structural basis for regulation of the nucleo-cytoplasmic distribution of Bag6 by TRC35. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(44), 11679–11684.
- Monis, P. T., Caccio, S. M., & Thompson, R. C. A. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, *25*(2), 93–100.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Sogin, M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, *317*(5846), 1921–1926.

- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., & Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *Journal of Cell Biology*, *151*(2), 367–379.
- Mukhopadhyay, R., Ho, Y. S., Swiatek, P. J., Rosen, B. P., & Bhattacharjee, H. (2006). Targeted disruption of the mouse Asna1 gene results in embryonic lethality. *FEBS Letters*, *580*(16), 3889–3894.
- Najdrová, V. (2022). Conserved mechanism for targeting of Tail-anchored proteins in eukaryotes. Charles University.
- Najdrová, V., Dohnálek, V., Voleman, L., & Doležal, P. Highly diverged pre-targeting complex in *Giardia intestinalis* reveals the evolution of GET pathway in eukaryotes. *Unpublished*.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 292.
- Nash, T. E., & Mowatt, M. R. (1992). Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *51*(2), 219–227.
- Nohýnková, E., Tůmová, P., & Kulda, J. (2006). Cell division of *Giardia intestinalis*: Flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryotic Cell*, *5*(4), 753–761.
- O'Donnell, J. P., Phillips, B. P., Yagita, Y., Juszkievicz, S., Wagner, A., Malinverni, D., Keenan, R. J., Miller, E. A., & Hegde, R. S. (2020). The architecture of EMC reveals a path for membrane protein insertion. *ELife*, *9*, 1–56.
- Onishi, M., Nagumo, S., Iwashita, S., & Okamoto, K. (2018). The ER membrane insertase Get1/2 is required for efficient mitophagy in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(1), 14–20.
- Pedrola, J. A., & Rüdiger, S. G. D. (2021). Double J-domain piloting of an Hsp70 substrate. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100717.
- Peng, D., & Tarleton, R. (2015). Eupagdt: A web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial Genomics*, *1*(4), 1–7.
- Petrů, M., Dohnálek, V., Füssy, Z., & Pavel, D. (2021). Fates of Sec, Tat, and YidC translocases in mitochondria and other eukaryotic compartments. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(12), 5241–5254.
- Philp, L. K., Day, T. K., Butler, M. S., Laven-Law, G., Jindal, S., Hickey, T. E., Scher, H. I., Butler, L. M., & Tilley, W. D. (2016). Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha (SGTA) ablation limits offspring viability and growth in mice. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–14.
- Pleiner, T., Tomaleri, G. P., Januszyk, K., Inglis, A. J., Hazu, M., & Voorhees, R. M. (2020). Structural basis for membrane insertion by the human ER membrane protein complex. *Science*, *369*(6502), 433–436.
- Powis, K., Schrul, B., Tienson, H., Gostimskaya, I., Breker, M., High, S., Schuldiner, M., Jakob, U., & Schwappach, B. (2013). Get3 is a holdase chaperone and moves to deposition sites for aggregated proteins when membrane targeting is blocked. *Journal of*

Cell Science, 126(2), 473–483.

- Rao, M., Okreglak, V., Chio, U. S., Cho, H., Walter, P., & Shan, S. O. (2016). Multiple selection filters ensure accurate tail-anchored membrane protein targeting. *ELife*, 5(December), 1–24.
- Rappsilber, J., Mann, M., & Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2(8), 1896–1906.
- Reboll, M. R., Korf-Klingebiel, M., Klede, S., Polten, F., Brinkmann, E., Reimann, I., Schönfeld, H. J., Bobadilla, M., Faix, J., Kensah, G., Gruh, I., Klintschar, M., Gaestel, M., Niessen, H. W., Pich, A., Bauersachs, J., Gogos, J. A., Wang, Y., & Wollert, K. C. (2017). EMC10 (Endoplasmic reticulum membrane protein complex subunit 10) is a bone marrow-derived angiogenic growth factor promoting tissue repair after myocardial infarction. *Circulation*, 136(19), 1809–1823.
- Rivera-Monroy, J., Musiol, L., Unthan-Fechner, K., Farkas, Á., Clancy, A., Coy-Vergara, J., Weill, U., Gockel, S., Lin, S. Y., Corey, D. P., Kohl, T., Ströbel, P., Schuldiner, M., Schwappach, B., & Vilardi, F. (2016). Mice lacking WRB reveal differential biogenesis requirements of tail-anchored proteins in vivo. *Scientific Reports*, 6, 1–13.
- Satoh, T., Ohba, A., Liu, Z., Inagaki, T., & Satoh, A. K. (2015). dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multi-pass membrane proteins in *Drosophila* photoreceptors. *ELife*, 2015(4), 1–21.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H. D., Schwappach, B., & Weissman, J. S. (2008). The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell*, 134(4), 634–645.
- Sharpe, H. J., Stevens, T. J., & Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell*, 142(1), 158–169.
- Shurtleff, M. J., Itzhak, D. N., Hussmann, J. A., Schirle Oakdale, N. T., Costa, E. A., Jonikas, M., Weibezahn, J., Popova, K. D., Jan, C. H., Sinitcyn, P., Vembar, S. S., Hernandez, H., Cox, J., Burlingame, A. L., Brodsky, J. L., Frost, A., Borner, G. H. H., & Weissman, J. S. (2018). The ER membrane protein complex interacts cotranslationally to enable biogenesis of multipass membrane proteins. *ELife*, 7, 1–23.
- Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A., & von Strandmann, E. P. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE*, 3(10).
- Simon, A. C., Simpson, P. J., Goldstone, R. M., Kryztofinska, E. M., Murray, J. W., High, S., & Isaacson, R. L. (2013). Structure of the Sgt2/Get5 complex provides insights into GET-mediated targeting of tail-anchored membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1327–1332.
- Singer, S. M., Yee, J., & Nash, T. E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign

- DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92(1), 59–69.
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 244–248.
- Sojka, S., Amin, N. M., Gibbs, D., Christine, K. S., Charpentier, M. S., & Conlon, F. L. (2014). Congenital heart disease protein 5 associates with CASZ1 to maintain myocardial tissue integrity. *Development (Cambridge)*, 141(15), 3040–3049.
- Soltys, B. J., Falah, M., & Gupta, R. S. (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to BiP Bohdan. *Journal of Cell Science*, 1917, 1909–1917.
- Stefanovic, S., & Hegde, R. S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, 128(6), 1147–1159.
- Stefer, S., Reitz, S., Wang, F., Wild, K., Pang, Y. Y., Schwarz, D., Bomke, J., Hein, C., Löhr, F., Bernhard, F., Denic, V., Dötsch, V., & Sinning, I. (2011). Structural basis for tail-anchored membrane protein biogenesis by the Get3-receptor complex. *Science*, 333(6043), 758–762.
- Suloway, C. J. M., Chartron, J. W., Zaslaver, M., & Clemons, W. M. (2009). Model for eukaryotic tail-anchored protein binding based on the structure of Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14849–14854.
- Suloway, C. J. M., Rome, M. E., & Clemons, W. M. (2012). Tail-anchor targeting by a Get3 tetramer: The structure of an archaeal homologue. *EMBO Journal*, 31(3), 707–719.
- Sun, C. H., Chou, C. F., & Tai, J. H. (1998). Stable DNA transfection of the primitive protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92(1), 123–132.
- Sundaram, A., Yamsek, M., Zhong, F., Hooda, Y., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2022). Substrate-driven assembly of a translocon for multipass membrane proteins. *Nature*, 611(7934), 167–172.
- Svärd, S. G., Meng, T. C., Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (1998). Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*, 30(5), 979–989.
- Tang, X., Wei, W., Snowball, J. M., Nakayasu, E. S., Bell, S. M., Ansong, C., Lin, X., & Whitsett, J. A. (2023). EMC3 regulates mesenchymal cell survival via control of the mitotic spindle assembly. *IScience*, 26(1), 105667.
- Tector, M., & Hartl, F. U. (1999). An unstable transmembrane segment in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO Journal*, 18(22), 6290–6298.
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), 1023–1025.
- Thress, K., Song, J., Morimoto, R. I., & Kornbluth, S. (2001). Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO Journal*, 20(5), 1033–1041.

- Thumuluri, V., Armenteros, Juan Almagro, Johansen, A. R., Nielsen, H., & Winther, O. (2022). Prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, 50(April), 1–7.
- Tomiczek, B., Delewski, W., Nierzwicki, L., Stolarska, M., Grochowina, I., Schilke, B., Dutkiewicz, R., Uzarska, M. A., Ciesielski, S. J., Czub, J., Craig, E. A., & Marszalek, J. (2020). Two-step mechanism of J-domain action in driving hsp70 function. *PLoS Computational Biology*, 16(6), 1–29.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., Van Der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., & Lucocq, J. M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426(6963), 172–176.
- Tůmová, P., Hofšetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O., & Král, J. (2007). Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma*, 116(1), 65–78.
- Tůmová, P., Uzlíková, M., Jurczyk, T., & Nohýnková, E. (2016). Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiology Open*, 5(4), 560–574.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. In *Nature Methods* (Vol. 13, Issue 9, pp. 731–740). Nature Publishing Group.
- Umair, M., Ballow, M., Asiri, A., Alyafee, Y., al Tuwajjri, A., Alhamoudi, K. M., Aloraini, T., Abdelhakim, M., Althagafi, A. T., Kafkas, S., Alsubaie, L., Alrifai, M. T., Hoehndorf, R., Alfares, A., & Alfadhel, M. (2020). EMC10 homozygous variant identified in a family with global developmental delay, mild intellectual disability, and speech delay. *Clinical Genetics*, 98(6), 555–561.
- van Kempen, M., Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., & Steinegger, M. (2024). Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nature Biotechnology*, 42(2), 243–246.
- Vilardi, F., Lorenz, H., & Dobberstein, B. (2011). WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Journal of Cell Science*, 124(8), 1301–1307.
- Vlad, I. A. (2018). The incidence of *Giardia intestinalis* in stool samples taken from children. *Analele Universitatii Din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie Si Tehnologii de Industrie Alimentara*, 17(B), 379–384.
- Vogl, C., Panou, I., Yamanbaeva, G., Wichmann, C., Mangosing, S. J., Vilardi, F., Indzhykulian, A. A., Pangršič, T., Santarelli, R., Rodriguez-Ballesteros, M., Weber, T., Jung, S., Cardenas, E., Wu, X., Wojcik, S. M., Kwan, K. Y., del Castillo, I., Schwappach, B., Strenzke, N., Moser, T. (2016). Tryptophan-rich basic protein (WRB) mediates insertion of the tail-anchored protein otoferlin and is required for hair cell exocytosis and hearing. *The EMBO Journal*, 35(23), 2536–2552.
- Volkmar, N., & Christianson, J. C. (2020). Squaring the EMC - How promoting membrane protein biogenesis impacts cellular functions and organismal homeostasis. *Journal of Cell Science*, 133(8), 1–14.

- Volkmar, N., Thezenas, M. L., Louie, S. M., Juskiewicz, S., Nomura, D. K., Hegde, R. S., Kessler, B. M., & Christianson, J. C. (2019). The ER membrane protein complex promotes biogenesis of sterol-related enzymes maintaining cholesterol homeostasis. *Journal of Cell Science*, *132*(2).
- Von Loeffelholz, O., Kriechbaumer, V., Ewan, R. A., Jonczyk, R., Lehmann, S., Young, J. C., & Abell, B. M. (2011). OEP61 is a chaperone receptor at the plastid outer envelope. *Biochemical Journal*, *438*(1), 143–153.
- Vondráčková, P. (2012). Nová proteáza v redukováných mitochondriích *Giardia intestinalis*. Univerzita Karlova.
- Voth, W., Schick, M., Gates, S., Li, S., Vilardi, F., Gostimskaya, I., Southworth, D. R., Schwappach, B., & Jakob, U. (2014). The protein targeting factor Get3 functions as ATP-independent chaperone under oxidative stress conditions. *Molecular Cell*, *56*(1), 116–127.
- Wang, F., Brown, E. C., Mak, G., Zhuang, J., & Denic, V. (2010). A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell*, *40*(1), 159–171.
- Wang, F., Chan, C., Weir, N. R., & Denic, V. (2014). The Get1/2 transmembrane complex is an endoplasmic-reticulum membrane protein insertase. *Nature*, *512*(7515), 441–444.
- Wang, F., Whynot, A., Tung, M., & Denic, V. (2011). The mechanism of tail-anchored protein insertion into the ER membrane. *Molecular Cell*, *43*(5), 738–750.
- Wang, P., & Dalbey, R. E. (2011). Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1808*(3), 866–875.
- Wang, Q. C., Zheng, Q., Tan, H., Zhang, B., Li, X., Yang, Y., Yu, J., Liu, Y., Chai, H., Wang, X., Sun, Z., Wang, J. Q., Zhu, S., Wang, F., Yang, M., Guo, C., Wang, H., Zheng, Q., Li, Y., Tang, T. S. (2016). TMCO1 is an ER Ca²⁺ load-activated Ca²⁺ channel. *Cell*, *165*(6), 1454–1466.
- Wang, Q., Liu, Y., Soetandyo, N., Baek, K., Hegde, R., & Ye, Y. (2011). A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation. *Molecular Cell*, *42*(6), 758–770.
- Wang, X., Li, Y., Qiang, G., Wang, K., Dai, J., McCann, M., Munoz, M. D., Gil, V., Yu, Y., Li, S., Yang, Z., Xu, S., Cordoba-Chacon, J., De Jesus, D. F., Sun, B., Chen, K., Wang, Y., Liu, X., Miao, Q., Liew, C. W. (2022). Secreted EMC10 is upregulated in human obesity and its neutralizing antibody prevents diet-induced obesity in mice. *Nature Communications*, *13*(1), 1–17.
- Wattenberg, B., & Lithgow, T. (2001). Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: Understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic*, *2*(1), 66–71.
- Wideman, J. G. (2015). The ubiquitous and ancient ER membrane protein complex (EMC): tether or not? *F1000Research*, *4*, 624.
- Winnefeld, M., Grewenig, A., Schnölzer, M., Spring, H., Knoch, T. A., Gan, E. C., Rommelaere, J., & Cziepluch, C. (2006). Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned

- chromosomes and mitotic arrest. *Experimental Cell Research*, 312(13), 2500–2514.
- Wunderley, L., Leznicki, P., Payapilly, A., & High, S. (2014). SGTA regulates the cytosolic quality control of hydrophobic substrates. *Journal of Cell Science*, 127(21), 4728–4739.
- Xin, B., Puffenberger, E. G., Turben, S., Tan, H., Zhou, A., & Wang, H. (2010). Homozygous frameshift mutation in TMCO1 causes a syndrome with craniofacial dysmorphism, skeletal anomalies, and mental retardation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 258–263.
- Xing, S., Mehlhorn, D. G., Wallmeroth, N., Asseck, L. Y., Kar, R., Voss, A., Denninger, P., Schmidt, V. A. F., Schwarzländer, M., Stierhof, Y. D., Grossmann, G., & Grefen, C. (2017). Loss of GET pathway orthologs in *Arabidopsis thaliana* causes root hair growth defects and affects SNARE abundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(8), E1544–E1553.
- Xiong, L., Zhang, L., Yang, Y., Li, N., Lai, W., Wang, F., Zhu, X., & Wang, T. (2020). ER complex proteins are required for rhodopsin biosynthesis and photoreceptor survival in *Drosophila* and mice. *Cell Death and Differentiation*, 27(2), 646–661.
- Xu, F., Jiménez-González, A., Einarsson, E., Ástvaldsson, Á., Peirasmaki, D., Eckmann, L., Andersson, J. O., Svärd, S. G., & Jerlström-Hultqvist, J. (2020). The compact genome of *Giardia muris* reveals important steps in the evolution of intestinal protozoan parasites. *Microbial Genomics*, 6(8), 1–15.
- Xu, Y., Cai, M., Yang, Y., Huang, L., & Ye, Y. (2012). SGTA recognizes a noncanonical ubiquitin-like domain in the Bag6-Ubl4A-Trc35 complex to promote endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell Reports*, 2(6), 1633–1644.
- Yabal, M., Brambillasca, S., Soffientini, P., Pedrazzini, E., Borgese, N., & Makarow, M. (2003). Translocation of the C-terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3489–3496.
- Yamamoto, Y., & Sakisaka, T. (2012). Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Molecular Cell*, 48(3), 387–397.
- Yan, J., He, C., & Zhang, H. (2003). The BAG-family proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 165(1), 1–7.
- Yee, J., & Nash, T. E. (1995). Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5615–5619.
- Zalisko, B. E., Chan, C., Denic, V., Rock, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Tail-anchored protein insertion by a single Get1/2 heterodimer. *Cell Reports*, 20(10), 2287–2293.
- Zamponi, N., Zamponi, E., Mayol, G. F., Lanfredi-Rangel, A., Svärd, S. G., & Touz, M. C. (2017). Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. *Traffic*, 18(9), 604–621.
- Zemanová, T. (2019). Charakterizace unikátních proteinů *Giardia intestinalis* a jejich úloha v biogenezi mitosomů. Charles University, Faculty of Science.
- Zhou, X., Xiao, B., Jiang, M., & Rui, J. (2024). Pan-cancer analysis identifies EMC6 as a

potential target for lung adenocarcinoma. *IScience*, 27(1), 108648.

Zhu, Q., Zhu, X., & Zhang, L. (2024). ER membrane complex (EMC): Structure, functions, and roles in diseases. *FASEB Journal*, 38(6), 1–16.

Zhu, X., Qi, X., Yang, Y., Tian, W., Liu, W., Jiang, Z., Li, S., & Zhu, X. (2020). Loss of the ER membrane protein complex subunit Emc3 leads to retinal bipolar cell degeneration in aged mice. *PLoS ONE*, 15(September), 1–17.

Zumthor, J. P., Cernikova, L., Rout, S., Kaech, A., Faso, C., & Hehl, A. B. (2016). Static clathrin assemblies at the peripheral vacuole—plasma membrane interface of the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, 12(7), 1–33.

10. Seznam příloh

Příloha 1: Tabulka dat z proteomické analýzy pull-down experimentu epizomálně exprimovaného Get1-BAP. Nachází se zde všechny identifikované proteiny u linie s Get1-BAP i kontrolní linie exprimující BirA.

Příloha 2: Tabulka dat z proteomické analýzy knock-outové linie s odstraněním *get1*. Nachází se zde všechny identifikované proteiny pozorované knock-outové linie i kontrolní wild-type linie (WB c6).