

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Parazitologie



Bc. Alena Dohnálková

Cytosolická hydrogenáza prvoka *Trichomonas vaginalis*

Cytosolic hydrogenase in *Trichomonas vaginalis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha 2015

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

V Praze dne 10. 8. 2015

.....

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Ivanovi Hrdému, Ph.D. za cenné rady, motivaci, vstřícnost a hlavně trpělivost, protože si uvědomuji, že to se mnou občas není lehké. Děkuji Pěťovi Radovi za to, že se mě před třemi lety ujal a pomohl mi v mých výzkumných začátcích. Děkuji Evičce Nývltové, která ví úplně všechno a neostýchá se o své znalosti podělit. Děkuji Honzovi Machovi za setkání, jehož protilátky zatím nenašly využití, a za zdatnou IT podporu. Děkuji Míše Marcinčikové za každou pomoc, radu i pokárání, které nás učí zodpovědnosti a udržuje v bdělosti. Velký dík patří také celému týmu protozoologické laboratoře za přátelskou a podnětnou atmosféru a ochotu poradit. Poslední velké DĚKUJI patří mé rodině, zejména mému manželovi Ondrovi za jeho bezmeznou lásku, pochopení a podporu ve všech mých rozhodnutích.

ABSTRAKT

Trichomonas vaginalis je bičíkatý mikroaerofilní prvok ze skupiny Excavata způsobující trichomoniázu, nejčastější nevirové sexuálně přenosné onemocnění na světě. Tato práce se zabývá studiem hydrogenáz, enzymů katalyzujících reverzibilní přeměnu protonů a elektronů na molekulární vodík. U *T. vaginalis* byly zatím hydrogenázy identifikovány pouze v hydrogenosomu, modifikované anaerobní mitochondrii podílející se na energetickém metabolismu. Nám se podařilo prokázat přítomnost tohoto enzymu také v cytosolu trichomonády. V genomu jsme mezi několika paralogy vytypovali gen pro předpokládanou cytosolickou hydrogenázu (C-Hyd) a overexprimovaný protein C-Hyd jsme posléze skutečně lokalizovali v cytosolu *T. vaginalis*. Na základě měření hydrogenázových aktivit v různých buněčných kompartmentech a frakcích získaných pomocí afinitiní chromatografie jsme dokázali, že protein C-Hyd má hydrogenázovou aktivitu a jedná se tedy o funkční hydrogenázu. Identifikace hydrogenázy v cytoplasmě *T. vaginalis* mění zažité představy o metabolismu trichomonády a otevírá dveře pro bádání nad dosud neprozkoumanými metabolickými možnostmi tohoto parazita.

Klíčová slova: *Trichomonas vaginalis*, hydrogenosom, hydrogenáza

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is a flagellated microaerophilic protozoan from the group Excavata that cause trichomoniasis, the most common nonviral sexually transmitted disease in the world. This thesis deals with the study of hydrogenases, enzymes catalyzing reversible conversion of protons and electrons to molecular hydrogen. In *T. vaginalis*, hydrogenases have been identified so far only in hydrogenosomes, modified anaerobic mitochondria that are involved in energy metabolism. We proved the presence of this enzyme also in the cytosol of *T. vaginalis*. Among several hydrogenase paralogues present in the genome, we selected an appropriate gene for the putative cytosolic hydrogenase (C-Hyd) and verified its cytosolic localization in the cells with overexpressed C-Hyd protein. Based on the determination of hydrogenase activities in different cell compartments and fractions obtained by affinity chromatography, we demonstrated the hydrogenase activity of C-Hyd protein, which means that C-Hyd is a functional hydrogenase. Identification of hydrogenase in *T. vaginalis* cytosol changes our understanding of trichomonad core metabolism and opens the door for the research of unexplored metabolic capabilities of this parasite.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, hydrogenosome, hydrogenase

OBSAH

1. Seznam použitých zkratk	9
2. Úvod	11
3. Literární přehled	12
3.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
3.2. Morfologie <i>Trichomonas vaginalis</i>	13
3.3. Hydrogenosom	14
3.4. Metabolismus hydrogenosomu	15
3.5. Hydrogenázy	19
3.5.1. Klasifikace hydrogenáz	19
3.5.2. [NiFe]-hydrogenázy	20
3.5.2.1. Struktura [NiFe]-hydrogenáz	20
3.5.2.2. Funkce [NiFe]-hydrogenáz	21
3.5.3. [FeFe]-hydrogenázy	23
3.5.3.1. Struktura [FeFe]-hydrogenáz	23
3.5.3.2. Funkce prokaryotických [FeFe]-hydrogenáz	24
3.5.3.3. Funkce eukaryotických [FeFe]-hydrogenáz	25
3.5.4. [Fe]-hydrogenázy	26
3.5.4.1. Struktura [Fe]-hydrogenáz	26
3.5.4.2. Funkce [Fe]-hydrogenáz	26
4. Cíle diplomové práce	27
5. Materiál a metody	28
5.1. Použité organismy	28
5.1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	28
5.1.2. <i>Escherichia coli</i>	28
5.2. Kultivace organismů	29
5.2.1. Kultivační média	29
5.2.2. Kultivační roztoky	30
5.3. Použité pufrý a roztoky	30
5.3.1. SDS-PAGE	30
5.3.2. Western blotová analýza	31
5.3.3. Protilátky	31
5.3.4. Imunofluorescence	32

5.3.5.	Frakcionace trichomonád	32
5.3.6.	Nativní proteinová elektroforéza	33
5.3.7.	Trypsinizace hydrogenosomů	33
5.3.8.	Izolace His-tagovaného proteinu na Ni-NTA koloně	33
5.3.9.	Biochemie.....	34
5.4.	Použité geny a proteiny	35
5.5.	Experimentální metody.....	36
5.5.1.	Amplifikace genů	36
5.5.2.	Analýza vzorků DNA/RNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu	37
5.5.3.	Extrakce DNA z agarózového gelu.....	37
5.5.4.	Ligace do TOPO® vektoru	37
5.5.5.	Transformace <i>E. coli</i>	37
5.5.6.	DNA Miniprep.....	38
5.5.7.	Štěpení TOPO® vektoru	38
5.5.8.	Ligace do vektoru TagVag	38
5.5.9.	SDS proteinová elektroforéza	39
5.5.10.	Western blotová analýza	39
5.5.11.	Imunodetekce proteinu na nitrocelulózové membráně	40
5.5.12.	DNA Midiprep	40
5.5.13.	Transfekce <i>T. vaginalis</i> elektroporací	40
5.5.14.	Příprava preparátů na imunofluorescenci.....	41
5.5.15.	Frakcionace trichomonád.....	41
5.5.16.	Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho	42
5.5.17.	Nativní proteinová elektroforéza.....	42
5.5.18.	Trypsinizace hydrogenosomů.....	43
5.5.19.	Izolace His-tagovaného proteinu na Ni-NTA agarózové koloně.....	43
5.5.20.	Stanovení latence hydrogenosomů.....	43
5.5.21.	Spektrofotometrické stanovení hydrogenázových aktivit	44
5.5.22.	Izolace RNA Trizolem	45
5.5.23.	Přepis RNA do cDNA.....	46
5.5.24.	qRT-PCR.....	46
6.	Výsledky	49
6.1.	Průkaz aktivit hydrogenáz v cytosolické frakci <i>T. vaginalis</i>	49
6.1.1.	Aktivity hydrogenáz naměřené spektrofotometricky	49

6.1.2.	Aktivity hydrogenáz detekované v gelu po nativní elektroforéze.....	49
6.1.3.	Vliv porušení latence hydrogenosomů na aktivitu hydrogenáz v jednotlivých buněčných frakcích	50
6.1.4.	Stanovení pH optima pro aktivitu hydrogenáz v hydrogenosomální a cytosolické frakci	52
6.2.	Stanovení vhodného genu pro cytosolickou hydrogenázu <i>T. vaginalis</i>	53
6.2.1.	Porovnání proteinových sekvencí hydrogenázových homologů <i>T. vaginalis</i>	53
6.2.2.	Relativní exprese nehydrogenosomálních homologů hydrogenáz <i>T. vaginalis</i>	54
6.3.	Lokalizace C-Hyd v buňkách <i>T. vaginalis</i>	55
6.3.1.	Lokalizace C-Hyd pomocí nepřímé imunofluorescence.....	55
6.3.2.	Lokalizace pomocí Western blotové analýzy	56
6.4.	Aktivita hydrogenáz v buňkách <i>T. vaginalis</i> s overexprimovanou C-Hyd-HA.....	57
6.5.	Izolace proteinu C-Hyd na Ni-NTA koloně.....	58
6.5.1.	Aktivita izolovaného proteinu C-Hyd-His	60
6.6.	Exprese hydrogenázových homologů různých linií <i>T. vaginalis</i>	61
7.	Diskuse.....	63
8.	Závěr	69
9.	Seznam použité literatury.....	70

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250
cDNA	komplementární DNA
C-Hyd	cytosolická hydrogenáza TVAG_447160
C-Hyd-HA	protein C-Hyd značený HA-tagem
C-Hyd-His	protein C-Hys značený His-tagem
CoA	koenzym A
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenylindol
dNTP	dinukleotid trifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
HA-tag	hemagglutininový tag
His-tag	polyhistidinový tag
Hmd	H ₂ -tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenáza
LGF	large granular fraction
ME	jablečný enzym (malic enzyme)
MV	metylvologen (N,N'-dimetyl-4,4'bipiridinium)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukována forma)
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukována forma)
NTA	kyselina nitrilotrioctová
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFO	pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
qRT-PCR	kvantitativní real-time PCR
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	relativní transkripce
SA	specifická aktivita

SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SOD	superoxid dismutáza
TLCK	tosyl-lysin-chlormetylketon
TPT	trifenyltetrazolium (2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid)
TRIS	Trizma base
TRIZOL	total RNA isolation reagent
Tv C-Hyd-HA	linie <i>T. vaginalis</i> s overexprimovanou C-Hyd s HA-tagem
Tv C-Hyd-His	linie <i>T. vaginalis</i> s overexprimovanou C-Hyd s His-tagem
TvT1	<i>T. vaginalis</i> kmen T1
TYM	Diamondovo médium

2. ÚVOD

Trichomonas vaginalis je mikroaerofilní bičíkatý prvok způsobující trichomoniázu, nejčastější neviróvé sexuálně přenosné onemocnění člověka. Každý rok se jím nakazí přes 250 milionů lidí. Nákaza *T. vaginalis* může působit komplikace v těhotenství a je rovněž rizikovým faktorem přenosu dalších pohlavních chorob. K léčbě se používají chemoterapeutika ze skupiny 5-nitroimidazolů, nejčastěji metronidazol.

Hydrogenázy jsou enzymy katalyzující vzájemnou přeměnu molekulárního vodíku s protony a elektrony podle reakce: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$. Přestože většina známých hydrogenáz dokáže tuto reakci *in vitro* katalyzovat v obou směrech, *in vivo* ji katalyzují přednostně pouze v jednom směru, který v závislosti na potřebách daného organismu vede buď ke spotřebě, nebo produkci vodíku.

Většina hydrogenáz jsou metaloenzymy, jež disponují jednak klasickými železo-sirnými klastry, jednak bimetalickými aktivními místy, která obsahují atomy niklu a železa, popř. dva atomy železa. Tato aktivní místa jsou svou strukturou pro hydrogenázy charakteristická a mezi jednotlivými organismy se příliš neliší. Převážná část hydrogenáz byla nalezena u mikroorganismů náležících k doménám Bacteria a Archaea, nicméně i u eukaryot jich bylo několik identifikováno.

Tématem této diplomové práce jsou cytosolické hydrogenázy *T. vaginalis*. Hydrogenázy *T. vaginalis* byly doposud popsány pouze v hydrogenosomu, kde katalyzují redukci protonů na molekulární vodík, který je jedním z konečných produktů energetického metabolismu hydrogenosomu. My jsme však měli důvod se domnívat, že hydrogenáza je přítomná také v cytosolu *T. vaginalis*, proto jsme se rozhodli naši hypotézu otestovat.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis je mikroaerofilní parazitický prvok, který spadá do říše Excavata a způsobuje urogenitální onemocnění člověka (Petrin et al., 1998). Trichomoniáza je nejčastější nevírová pohlavně přenosná choroba člověka s incidencí přesahující 250 milionů nakažených ročně (WHO, 2012).

Spektrum projevů trichomoniázy sahá od asymptomatických infekcí až po vaginitidu u žen (Rein, 1989) a uretritidu u mužů (Krieger, 1989). U těhotných žen může nákaza *T. vaginalis* vést k předčasným porodům a nízké porodní váze novorozenců (Cotch et al., 1997). Infekce *T. vaginalis* byla také označena za jeden z rizikových faktorů pohlavního přenosu HIV/AIDS (Laga et al., 1993).

Trichomoniázu lze efektivně léčit deriváty 5-nitroimidazolů. Nejpoužívanějším lékem je metronidazol, který vstupuje do buňky pasivní difúzí. Uvnitř buňky se zřejmě různými mechanismy aktivuje a poškozuje buněčné struktury (Lossick, 1989; Leitsch et al., 2009).

Dle fylogenetických stromů sestavených na základě podobnosti rRNA malé ribozomální podjednotky byla dříve *T. vaginalis* považována za primitivního, primárně amitochondriálního eukaryota (Cavilier-Smith, 1993; Sogin, 1997), a byla řazena do skupiny Archezoa (Keeling, 1998). Posléze však byly v genomu *T. vaginalis* nalezeny geny mitochondriálního původu, jako např. chaperonin 60 (Roger et al., 1996), 70kDa heat shock protein (Germot et al., 1996), nebo valyl-tRNA syntetáza (Hashimoto et al., 1998). Stejně tak byly mitochondriální geny nalezeny v dalších, do té doby „amitochondriálních“ protistech, jako jsou např. *Giardia intestinalis* (Soltys & Gupta, 1994; Hashimoto et al., 1998), *Entamoeba histolytica* (Clark & Roger, 1995) či mikrosporidie *Nosema locustae* (Germot et al., 1997). Tyto objevy vedly k vyvrácení hypotézy o současné existenci primárně amitochondriálních eukaryot. *T. vaginalis* postrádá klasické mitochondrie, ale místo nich má hydrogenosomy, orgány anaerobního energetického metabolismu, které s mitochondrií sdílejí společného evolučního předka (Bui et al., 1996).

3.2. Morfologie *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis je jednobuněčný eukaryotický organismus kulovitého až améboidního tvaru o velikosti cca 10 x 7 µm (Honigberg & King, 1964; Honigberg & Brugerolle, 1989). Tvar buňky závisí na prostředí, ve kterém se trichomonáda nachází (Arroyo et al., 1993). Zatímco v axenické kultuře má trichomonáda typicky kulovitý až vřetenovitý tvar, při kontaktu s vaginálními epiteliálními buňkami se změnila na buňku améboidní.

Buňka je obklopená typickou cytoplasmatickou membránou a vybavená pěti bičíky, z nichž jeden je zpětný a lemují undulující membránu. Ostatní čtyři bičíky jsou volné a nacházejí se v apikální části buňky (Honigberg & King, 1964).

Bičíky společně s kinetosomy (bazální tělíska) a s nimi asociovanými centrosomy tvoří strukturu zvanou mastigont (Brugerolle, 1991). Mastigont je propojen s cytoskeletárními strukturami peltou a axostylem tvořenými jednou vrstvou navzájem propojených mikrotubulů. Pelta se nachází nad jádrem v přední části buňky a chrání kinetosomy. Axostyl je nekontraktilní, vede skrze celou buňku, v anteriorní části se stáčí do trychtýře, v jehož ústí sedí jádro, a v posteriorní části vyčnívá z buňky ven (Brugerolle, 1975-76). U trichomonás také najdeme nápadné žíhané fibrily – costu a parabasální fibrily. Costa probíhá podél undulující membrány a slouží jako její podpora. Parabasální fibrily jsou asociované s Golgiho komplexem a společně tvoří pro trichomonády charakteristický parabasální aparát (Brugerolle, 1975-76).

Jádro trichomonád je haploidní a obsahuje šest telomerických chromosomů (Samuels, 1980; Drmota & Král, 1997). Jádro se dělí tzv. extranukleární uzavřenou mitózou, při které zůstává jaderná membrána celistvá (Brugerolle, 1975) a dělicí vřeténko se nachází mimo jádro.

Jak již bylo zmíněno, trichomonády postrádají klasické mitochondrie; místo nich mají hydrogenosomy, organely specifické pro některá anaerobní protista. V buňce se typicky nacházejí perinukleárně a dále podél costy a axostylu (Lindmark & Müller, 1973; Benchimol et al. 1996).

V cytoplasmě trichomonád lze také najít drsné endoplasmatické retikulum, volné ribosomy, glykogenová granula sloužící jako zásoba substrátu pro glykolýzu a různorodé vakuoly a váčky související s endocytickými aktivitami, fagocytózou a pinocytózou (Brugerolle, 1972; Benchimol et al. 1981).

3.3. Hydrogenosom

Hydrogenosom je organela anaerobního metabolismu, která nahradila klasickou aerobní mitochondrii. Za anaerobních podmínek hydrogenosom produkuje vodík jako koncový metabolit oxidace pyruvátu nebo malátu (Müller, 1993).

Hydrogenosomy *T. vaginalis* mají kulovitý tvar o průměru cca 0,5 µm, zabírají přibližně 6 % objemu buňky a jsou ohraničené dvěma těsně přiléhajícími membránami, mezi kterými se mohou vyskytovat mezimembránové váčky obohacené o Ca²⁺ (Benchimol & de Souza, 1983; Honigberg et al., 1984). Hydrogenosomy jsou vyplněné granulární matrix často s elektrondensním jádrem (obr. 1).

Hydrogenosomy vznikají stejně jako mitochondrie pouze dělením již existujících organel, nikdy nevznikají *de novo* pučením z endoplasmatického retikula (ER) (Benchimol et al., 1996). Vyskytují se však v těsné blízkosti ER, proto se předpokládá, že ER se podílí na přísunu lipidů, které jsou zabudovány do membrán hydrogenosomu při jeho zvětšování a dělení (Benchimol et al., 1996).

Hydrogenosom na rozdíl od mitochondrie postrádá DNA (Turner & Müller, 1983; Clemens & Johnson, 2000). Veškeré hydrogenosomální proteiny jsou u trichomonád kódovány jadernou DNA a syntetizují se na volných polyribosomech v cytosolu, odkud jsou následně nesbalené transportovány do hydrogenosomu (Lahti & Johnson, 2000). Transport proteinů do hydrogenosomu probíhá stejnými mechanismy, jaké jsou známy u mitochondrie. Matrixové proteiny mají N-terminální sekvenci, která slouží jako importní signál a po přenosu do hydrogenosomu je odštěpena (Johnson et al., 1990; Johnson et al., 1993; Plümper et al., 1998). Kromě N-terminální signální sekvence se při transportu uplatňuje také vnitřní signální sekvence, která je přítomna především v proteinech lokalizovaných do vnitřní hydrogenosomální membrány (Pfanner & Geissler, 2001). Hydrogenosomální signální sekvence jsou bohaté na hydrofobní a hydroxylované aminokyseliny (Johnson et al., 1990; Johnson et al. 1993; Bradley et al., 1997). Typicky se v sekvenci hojně vyskytuje leucin, serin a threonin, přičemž leucin bývá na 2. pozici od N-terminálního konce. Dalšími specifickými aminokyselinami jsou arginin, který se vyskytuje na pozici -2 nebo -3 od místa štěpení, a fenylalanin či asparagin, které se nacházejí na pozici -1 od místa štěpení. Hydrogenosomální a mitochondriální signální sekvence jsou si velmi podobné, liší se především délkou. Signální sekvence mitochondriálních proteinů obsahuje obvykle 20-80 aminokyselin, zatímco hydrogenosomální signální sekvence je typicky 5-20 aminokyselin dlouhá (Johnson et al., 1995). Transport proteinů do hydrogenosomu vyžaduje ATP,

elektrochemický gradient (Bradley et al., 1997) a membránové transportéry (Plümper et al., 2000; Reda et al., 2011).

Příklad hydrogenosomálních signálních sekvencí:

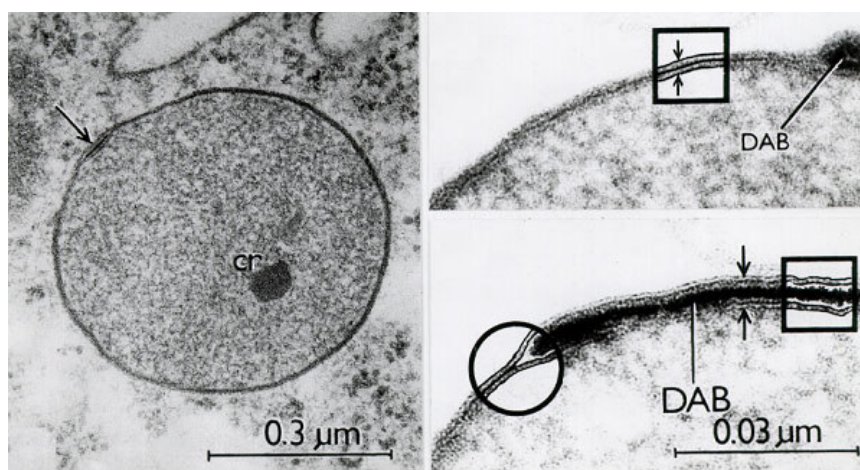
jablečný enzym

MLTSSVSPVRN

hydrogenáza

MLATASASTSNILRN

X – aminokyseliny leucin a arginin v konzervativní pozici signální sekvence



Obr. 1: Hydrogenosom. (A) Celý hydrogenosom obsahující granulární matrix, elektrondensní jádro – cr, a mezimembránový měchýřek bohatý na Ca^{2+} . (B) Detail těsně přiléhajících membrán hydrogenosomu. (C) Detail mezimembránového měchýřku s nahromaděným Ca^{2+} (převzato z Čerkasovová et al., 1973).

3.4. Metabolismus hydrogenosomu

Metabolismus hydrogenosomu u trichomonád je relativně dobře prostudován (obr. 2). Hlavní známou funkcí hydrogenosomu *T. vaginalis* týkající se metabolismu karbohydrátů jsou reakce „extended“ glykolýzy oxidativně dekarboxylující pyruvát a malát na acetát, CO_2 a vodík (Müller, 1993).

Pyruvát buď vstupuje do hydrogenosomu jako produkt glykolýzy v cytosolu, nebo je tvořen přímo v hydrogenosomu oxidativní dekarboxylací malátu pomocí malát dehydrogenázy (dekarboxylující) (Hrdý & Müller, 1995b; Drmota et al., 1996). Klíčovým enzymem hydrogenosomu zodpovědným za dekarboxylaci pyruvátu je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), která katalyzuje jeho oxidaci za vzniku acetyl-CoA a CO_2 (Lindmark & Müller, 1973; Williams et al., 1987). CoA z acetyl-CoA je následně v reakci katalyzované acetát:sukcinát CoA transferázou přenesen na sukcinát, čímž vzniká acetát jako konečný

produkt, a sukcinyl-CoA, který slouží jako substrát pro substrátovou fosforylaci produkující ATP pomocí sukcinát thiokinázy; CoA se recykluje (Jenkins et al., 1991). Elektrony uvolňované při oxidaci pyruvátu jsou přenášeny na feredoxin, který je dále předává hydrogenáze, která je za anaerobních podmínek přenáší na protony za vzniku molekulárního vodíku (Müller, 1993). Výsledkem metabolismu pyruvátu v hydrogenosomu je tedy vznik jedné molekuly ATP na jednu molekulu pyruvátu a uvolnění acetátu, vodíku a CO₂ jako konečných produktů (Müller, 1993).

PFO v hydrogenosomu zastává stejnou funkci jako pyruvát dehydrogenázový komplex v mitochondrii (Williams et al., 1987; Hrdý & Müller, 1995a). Jedná se o homodimer složený ze dvou 120kDa podjednotek, který obsahuje vazebné místo pro thiamin pyrofosfát a několik [4Fe-4S] klastrů (Williams et al., 1987). Trichomonáda v genomu kóduje sedm paralogů tohoto proteinu (Carlton et al., 2007), všechny jsou patrně v různé míře exprimovány (Schneider et al., 2011; Smutná, nepublikované výsledky).

Hydrogenosom postrádá veškeré hemové proteiny, jako hlavní přenašeč elektronů zde slouží feredoxin, malý protein o molekulové hmotnosti cca 10 kDa, který se v přírodě vyskytuje v několika formách charakterizovaných rozdílným uspořádáním FeS klastrů a širokým rozpětím redoxních potenciálů. Hydrogenosomální feredoxin *T. vaginalis* obsahuje [2Fe2S] klastr (Gorell et al., 1984) a jeho redoxní potenciál činí -347 mV (Vidakovic et al., 1996). Feredoxin trichomonád se tak více podobá feredoxinům aerobních bakterií a mitochondrií, nežli feredoxinům dalších anaerobních protist (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*), která mají feredoxiny s [4Fe4S] klastry (Coombs & Müller, 1995).

Redukovaný feredoxin slouží jako donor elektronů pro hydrogenázu, která je přenáší na protony za tvorby molekulárního vodíku (Lindmark & Müller, 1973). Hydrogenázy přítomné u *T. vaginalis* byly charakterizovány jako [FeFe] hydrogenázy (Payne et al., 1993), které jsou typické pro anaerobní bakterie jako např. *Clostridium pasteurianum* a *Desulfovibrio vulgaris* (Meyer & Gagnon, 1991; Yagi et al., 1985). *T. vaginalis* kóduje ve svém genomu deset hydrogenázových paralogů (Carlton et al., 2007), pouze pět z nich však bylo nalezeno v proteomu hydrogenosomu trichomonády (Schneider et al., 2011).

Nejvíce exprimovaným proteinem hydrogenosomu je jablečný enzym (malát dehydrogenáza dekarboxylující), který katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát. Jako akceptor elektronů využívá přednostně NAD⁺ (Drmotá et al., 1996). Hydrogenosomální jablečný enzym je vázaný na membránu (Drmotá et al., 1996), má velikost cca 63 kDa a řadí se do rodiny eukaryotických jablečných enzymů (Doležal et al.,

2004). V genomu *T. vaginalis* je kódováno devět paralogů tohoto proteinu (Carlton et al., 2007).

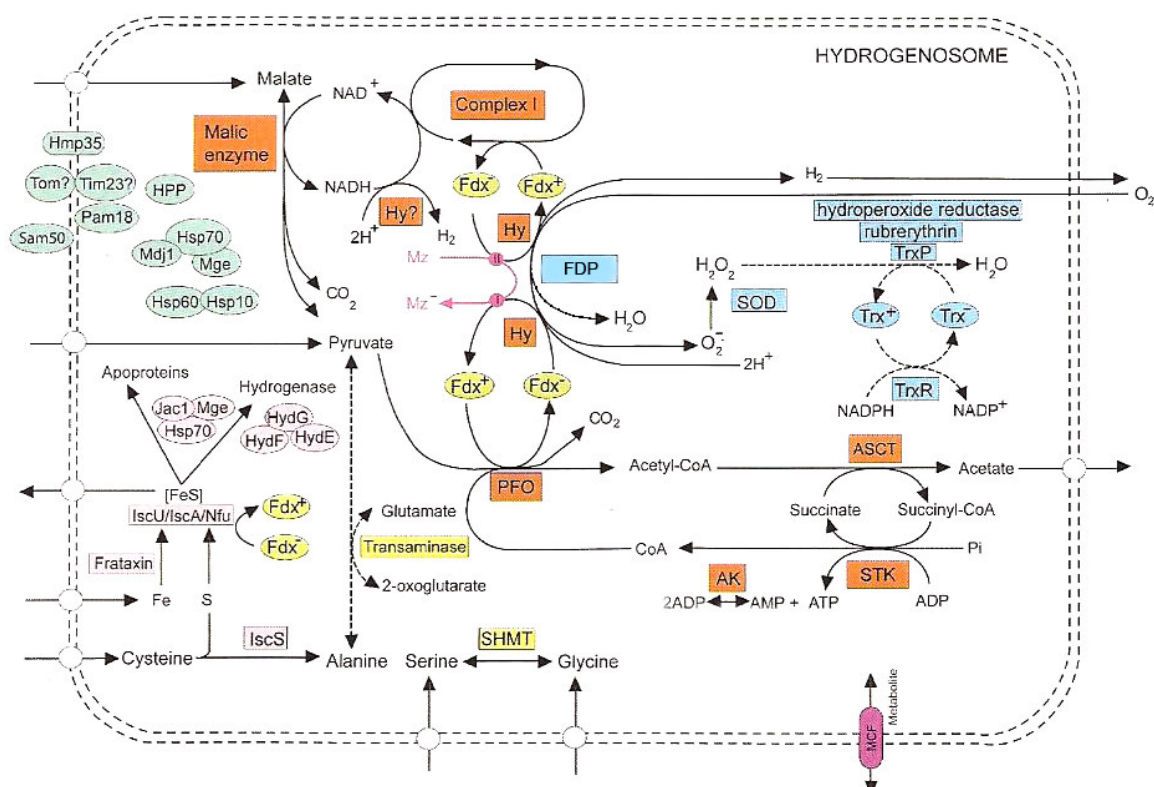
V hydrogenosomu *T. vaginalis* je přítomna také NADH dehydrogenáza, komponenta respiračního komplexu I, která je jedinou zachovanou komponentou mitochondriálního respiračního řetězce u trichomonády (Hrdý et al., 2004). NADH dehydrogenáza *T. vaginalis* se skládá z pouhých dvou katalytických podjednotek (eukaryotický respirační komplex I má více než 40 podjednotek) (Dyall et al., 2004; Hrdý et al., 2004) a hraje důležitou roli při regeneraci NAD^+ , protože reoxiduje NADH produkované hydrogenosomálním jablečným enzymem (Hrdý et al., 2004). Kromě toho je schopna díky své NADH:ferredoxin oxidoreduktázové aktivitě redukovat ferredoxin, a tím vedle PFO poskytuje další redukční sílu (Müller, 1993).

Ačkoli jsou trichomonády považovány za anaerobní protista, ukázalo se, že *T. vaginalis* je schopna tolerovat nízké koncentrace kyslíku (Paget & Lloyd, 1990). Za aerobních podmínek hydrogenosomy stále produkují acetát a CO_2 , ale nedochází k uvolňování vodíku, protože organela využívá jako terminální akceptor elektronů kyslík. Kyslík může být částečně redukován neenzymaticky pomocí redukovaného ferredoxinu nebo flavinových kofaktorů, čímž vznikají toxické produkty, jako je H_2O_2 nebo superoxidový radikál, které způsobují oxidativní stres. Enzymaticky může být kyslík redukován za pomoci flavodiiron proteinu, který kyslík redukuje na vodu (Smutná et al., 2009). Redukce kyslíku však není spjatá s produkcí ATP jako v mitochondrii, ATP je stále produkováno substrátovou fosforylací (Lloyd & Kristensen, 1985; Lloyd & Pedersen, 1985). Reaktivních forem kyslíku (ROS) se musí buňka umět zbavit. Superoxidový radikál je redukován pomocí superoxid dismutázy (SOD), která katalyzuje přeměnu dvou superoxidových radikálů na H_2O_2 a kyslík a v hydrogenosomu je přítomna (Pütz et al., 2005). Peroxid vodíku bývá redukován pomocí katalázy či glutathion peroxidázy (Halliwell, 1989), *T. vaginalis* však tyto dva enzymy postrádá. Předpokládá se, že funkci glutathionu zastává zejména cystein a další thiol, jako např. propanthiol nebo H_2S (Ellis et al., 1994). Pro detoxifikaci H_2O_2 dále trichomonáda zřejmě využívá rubrerytrin a 2-Cys peroxiredoxinový systém (Pütz et al., 2005). Peroxiredoxinový systém zahrnuje thioredoxin peroxidázu, thioredoxin, thioredoxin reduktázu a zdroj redukčních ekvivalentů, v tomto případě NADPH (McGonigle et al., 1998).

Enzymy citrátového cyklu s výjimkou sukcinát thiokinázy (Müller, 1973), stejně jako cytochromy, cytochrom oxidáza (Lloyd et al., 1979b), ani F_0F_1 ATPáza (Lloyd et al., 1979a) nebyly v hydrogenosomu trichomonád nalezeny.

Hydrogenosomální metabolismus má zásadní význam pro léčbu trichomoniázy. V hydrogenosomu jsou totiž aktivovány léky ze skupiny 5-nitroimidazolů, jako např. metronidazol, které dávají vznik cytotoxickým radikálům poškozujícím buněčné struktury. Metronidazol se do buňky a následně do hydrogenosomu dostává pasivní difúzí. V hydrogenosomu poté slouží jako přednostní akceptor elektronů z feredoxinu místo hydrogenázy, čímž zamezuje tvorbě vodíku (Lloyd & Kristensen, 1985). Léčba trichomoniázy metronidazolem je obvykle velmi účinná, přesto však může dojít k vytvoření rezistence. Ke vzniku rezistence dokáže trichomonáda využít kyslík v prostředí. Jedná se tedy o aerobní rezistenci, při které kyslík buď reoxiduje vzniklý radikál metronidazolu, nebo s metronidazolem kompetuje o elektrony. Aerobní rezistence předchází úplné anaerobní rezistenci (navozené experimentálně *in vitro*), která je spojená s postupnou ztrátou exprese některých důležitých hydrogenosomálních enzymů, jako jsou PFO či hydrogenosomální jablečný enzym. Tyto enzymy poskytují elektrony feredoxinu, který metronidazol redukuje. U vysoce rezistentních kmenů *T. vaginalis* postupně vymizí také exprese feredoxinu a hydrogenázy (Quon et al. 1992; Kulda, 1999).

V roce 2009 se však ukázalo, že k aktivaci metronidazolu by nemuselo docházet pouze v hydrogenosomu, ale také v cytosolu pomocí thioredoxin reduktázy (Leitsch et al. 2009).



Obr. 2: Navržená mapa metabolismu hydrogenosomu *T. vaginalis*. Oranžové pravouhelníky představují známé enzymy podílející se na energetickém metabolismu. Žluté ovály znázorňují

ferredoxiny (Fdx) sloužící jako donory elektronů pro hydrogenázy, které následně produkují vodík. V přítomnosti metronidazolu, který je znázorněn růžově, Fdx předává elektrony léčivu, čímž ho aktivuje. Předpokládané funkce dalších proteinů, odhalených na základě analýzy genomu, jsou označeny následovně: růžová, skládání železo-sírných klastrů a maturace hydrogenáz; modrá, dráhy detoxifikace kyslíku; žlutá, metabolismu aminokyselin; zelená, translokace a maturace proteinů. Prázdné kroužky v membráně naznačují neidentifikované transportéry, které pravděpodobně zprostředkovávají transport substrátů a metabolitů. Seznam zkratk: AK, adenylát kináza; Fdx, ferredoxin; Hy, hydrogenáza; Hy?, předpokládaná fúzní hydrogenáza s NAD-vazebnou doménou; PFO, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; SOD, superoxid dismutáza; STK, sukcinát thiokináza (sukcinát CoA ligáza, sukcinyl-CoA syntetáza); SHMT, serin hydroxymetyl transferáza; Trx, thioredoxin; TrxP, thioredoxin peroxidáza; TrxR, thioredoxin reduktáza; ASCT, sukcinyl-CoA:acetát CoA transferáza; FDP, flavodiiron protein typu A; HydG, HydF a HydE, pomocné maturázy Fe hydrogenázy; IscS, cystein desulfuráza; IscU, molekulární „scaffold protein“ pro FeS proteiny; IscA a Nfu, alternativní „scaffold protein“ pro FeS proteiny; Hsp 70, Hsp60 a Hsp10, proteiny tepelného šoku („heat shock proteins“); Jac1 a Mdj1, kochaperony obsahující J-doménu; Mge, „nucleotide exchange factor“; HPP, hydrogenosomální procesivní peptidáza; Hmp35, hydrogenosomální integrální membránový protein; Tom?, předpokládaná translokáza vnější membrány; Tim23?, hlavní translokáza vnitřní membrány; Sam50, hlavní translokáza komplexu „sorting and assembly machinery“; Pam18, „J-domain containing protein of the presequence translocase associated motor komplex“; MCF, „mitochondrial carrier family protein“ (Hmp31, ATP/ADP přenašeč). Přerušovaná čára představuje předpokládané reakce (upraveno podle Hrdý et al., 2007).

3.5. Hydrogenázy

Hydrogenázy jsou enzymy, které se podílejí na metabolismu vodíku. Jejich úlohou je katalýza jednoduché chemické reverzibilní reakce: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$. Všechny hydrogenázy jsou schopné fungovat oběma směry, ale zpravidla upřednostňují pouze jeden směr. Podle toho, kterým směrem reakce probíhá, rozeznáváme hydrogenázy pohlcující (oxidující) H_2 , hydrogenázy uvolňující H_2 a obousměrné hydrogenázy. Většina organismů metabolizujících H_2 patří mezi prokaryota, nicméně i mezi jednobuněčnými eukaryoty nalezneme zástupce, kteří jsou schopni uvolňovat H_2 (Vignais & Billoud, 2007).

3.5.1. Klasifikace hydrogenáz

Hydrogenázy jsou obvykle klasifikovány na základě struktury aktivního místa. Většina známých hydrogenáz spadá do dvou hlavních tříd, které tvoří [NiFe]- a [FeFe]-hydrogenázy. [NiFe]-hydrogenázy mají v aktivním místě atom niklu a atom železa, zatímco aktivní místo [FeFe]-hydrogenáz obsahuje dva atomy železa. Kromě binukleárních center se obě tyto třídy

hydrogenáz vyznačují tím, že disponují železo-sirnými klastry. Třetí třídu hydrogenáz tvoří [Fe]-hydrogenázy, které postrádají Fe-S klastry a v aktivním místě mají pouze jeden atom železa. Třída [Fe]-hydrogenáz je reprezentována pouze jediným enzymem, H₂-tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenázou (Hmd), která byla nalezena v některých metanogenních organismech (Vignais & Billoud, 2007; Yagi & Higuchi, 2013).

Kromě dělení hydrogenáz do tříd podle struktury aktivního místa se zejména dříve uplatňovala také klasifikace na základě využívaných specifických elektronových donorů a akceptorů. Mezi nejvyužívanějšími elektronovými přenašeči figurují zejména feredoxin, NAD, cytochromy a koenzym F₄₂₀ (Vignais & Billoud, 2007; Yagi & Higuchi, 2013). Mezi typem aktivního místa a specifickým elektronovým přenašečem však neexistuje žádná korelace.

3.5.2. [NiFe]-hydrogenázy

Nejprostudovanější a nejpočetnější třídou hydrogenáz jsou [NiFe]-hydrogenázy bakterií z domény Bacteria, najdeme je však i u zástupců Archaea. U eukaryot nebyly [NiFe]-hydrogenázy popsány (Vignais & Billoud, 2007).

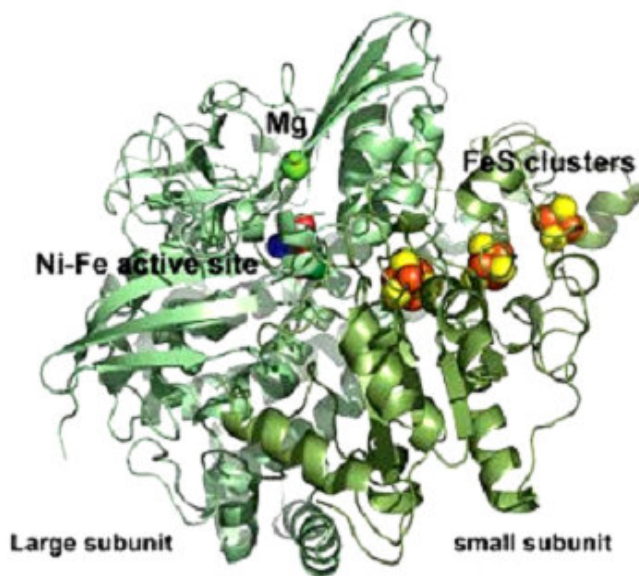
3.5.2.1. Struktura [NiFe]-hydrogenáz

Standardní [NiFe]-hydrogenázy jsou dobře prostudované u bakterií *Desulfovibrio gigas* a *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Volbeda et al., 1995; Higuchi et al., 1997) a skládají se z velké α -podjednotky o velikosti cca 60 kDa a z malé podjednotky velké cca 30 kDa (Yagi et al., 1976). Obě podjednotky spolu tvoří globulární heterodimer, jeho aktivní místo se nachází ve velké podjednotce, zatímco malá podjednotka obsahuje tři Fe-S klastry (Volbeda et al., 1995). Bimetalické aktivní místo tvořené atomem niklu a železa je koordinováno sirnými atomy čtyř cysteinových zbytků, atom železa je též k tomu čtyřmi neproteinovými ligandy (Volbeda et al., 1996). Tyto ligandy mohou být tvořeny molekulami CN, CO, či SO (De Lacey et al., 1997; Higuchi et al., 1997). Mezi atomy aktivního místa se nachází dále v ligand, tzv. bridging ligand, který je představován kyslíkovým radikálem, hydroperoxidem, či hydroxidovým iontem (Volbeda et al., 1996; Ogata et al., 2005; Volbeda et al., 2005). Kromě bimetalického NiFe centra bylo ve velké podjednotce identifikováno Mg²⁺ centrum, jeho úloha je však nejasná (Higuchi et al., 1997). Malá podjednotka váže dva [4Fe-4S] klastry a jeden [3Fe-4S] klastr. Tyto Fe-S klastry jsou koordinovány téměř výhradně sirnými atomy cysteinových zbytků, výjimku tvoří jeden histidinový ligand (Volbeda et al., 1995; Higuchi et al., 1997). Aktivní místo uvnitř proteinu je spojeno s povrchem pomocí

hydrofobního kanálu (Ogata et al., 2009). Struktura [NiFe]-hydrogenáz je znázorněna na obr. 3.

Kromě standardních [NiFe]-hydrogenáz dále existují [NiFeSe]-hydrogenázy popsané např. u bakterií *Desulfomicrobium baculatum* a *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Garcin et al., 1999; Marques et al., 2010). Tyto hydrogenázy se od standardních [NiFe]-hydrogenáz odlišují tím, že obsahují tři [4Fe-4S] klastry. Kromě toho je jeden z cysteinových zbytků koordinujících atom niklu v aktivním místě nahrazen selenocysteinem a monometalické centrum obsahuje místo hořčíku atom železa. Bridging ligand mezi atomy niklu a železa nebyl nalezen (Garcin et al., 1999; Marquez et al., 2010).

Poslední skupinou jsou [NiFe]-hydrogenázy odolné vůči kyslíku, které byly nalezené pouze u několika druhů, např. u *Hydrogenovibrio marinus* (Nishihara et al., 1997) a *Ralstonia eutropha* H16 (Burgdorf et al., 2005). Na rozdíl od standardních [NiFe]-hydrogenáz mají místo jednoho [4Fe-4S] klastru koordinovaného čtyřmi cysteinovými zbytky [4Fe-3S] klastr koordinovaný šesti cysteinovými zbytky (Shomura et al., 2011; Fritsch et al., 2011).



Obr. 3: Struktura [NiFe]-hydrogenázy *D. vulgaris* Miyazaki (převzato z Ogata et al., 2009).

3.5.2.2. Funkce [NiFe]-hydrogenáz

[NiFe]-hydrogenázy lze na základě jejich buněčné funkce rozdělit do pěti skupin. První skupina zahrnuje [NiFe]-hydrogenázy pohlcující H_2 , tzv. respirační hydrogenázy, které buňce umožňují využívat H_2 jako zdroj energie. Při anaerobní respiraci je oxidace H_2 spojena s redukcí elektronových akceptorů jako NO_3^- , SO_4^{2-} , fumarát, nebo CO_2 . Při aerobní respiraci je oxidace vodíku spojena s redukcí O_2 . Energie je získávána ve formě protonmotivní síly (Vignais & Colbeau, 2004). Anaerobní respirace je velmi dobře prostudována u ϵ -

proteobakterie *Wolinella succinogenes*, jejíž hydrogenáza je membránová, jako akceptor elektronů využívá fumarát a jako donor elektronů H_2 nebo formiát (Kröger et al., 2002).

Druhou skupinu [NiFe]-hydrogenáz tvoří sinicové hydrogenázy pohlcující H_2 a senzorické hydrogenázy sloužící k detekci H_2 . Jedná se o cytoplazmatické hydrogenázy (Vignais & Colbeau, 2004). Sinicové hydrogenázy byly nalezeny u všech dosud popsaných sinic fixujících dusík. Činnost hydrogenázy v buňce je spojená s aktivitou nitrogenázy, která fixuje N_2 . Oba enzymy tedy fungují společně (Tamagnini et al., 2002). Senzorické hydrogenázy jsou označovány jako regulační hydrogenázy, jejichž úlohou je zjištění přítomnosti H_2 v prostředí následované spuštěním kaskády buněčných reakcí vedoucích k syntéze respiračních hydrogenáz. Na rozdíl od ostatních hydrogenáz tedy nezajišťují buňce přísun energie (Kleinhues et al., 2000).

Třetí skupina [NiFe]-hydrogenáz zahrnuje obousměrné heteromultimerní cytoplazmatické hydrogenázy, jejichž dimerní hydrogenázová podjednotka je spojena s dalšími podjednotkami schopnými vázat solubilní kofaktory, jako např. NAD, NADP, či F_{420} . Tyto obousměrné hydrogenázy fungují reverzibilně a za anaerobních podmínek mohou využívat protony vody jako akceptor elektronů pro reoxidaci těchto kofaktorů (Vignais & Colbeau, 2004). Tyto hydrogenázy se vyskytují zejména u archeí, např. u hypertermofila *Pyrococcus furiosus*, jehož hydrogenáza je schopná katalyzovat jak produkci H_2 , tak redukci síry a polysulfidů na H_2S , přičemž produkci sulfidu dává přednost (Ma et al., 2000).

Čtvrtou skupinu [NiFe]-hydrogenáz tvoří membránové hydrogenázy přeměňující energii a uvolňující H_2 , které se skládají ze šesti a více podjednotek a redukují protony vody, aby se zbavily přebytečného množství redukčních ekvivalentů vzniklých oxidací C_1 organických sloučenin, jako jsou CO nebo formiát (Vignais & Colbeau, 2004). Většina hydrogenáz z této skupiny byla nalezena u archeí, např. u metanogena *Methanosarcina barkeri*, jehož hydrogenáza má schopnost katalyzovat reverzibilní redukci feredoxinu vodíkem. Tato hydrogenáza katalyzuje tvorbu H_2 z redukovaného feredoxinu, který vzniká při metanogenezi využívající aceton jako substrát. Kromě metanogeneze se uplatňuje také při biosyntéze pyruvátu, která vyžaduje elektrony z redukovaného feredoxinu. Energie pro redukci feredoxinu je pravděpodobně získávána translokací protonů přes buněčnou membránu (Meuer et al., 2002).

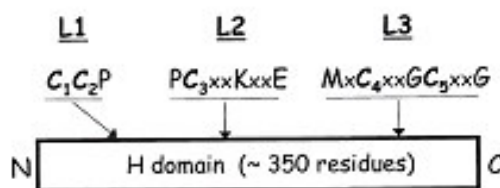
Pátá skupina byla popsána nedávno na základě genomické, fylogenetické a biochemické analýzy zvláštních [NiFe]-hydrogenáz z půdních bakterií *Streptomyces* spp., které mají vysokou afinitu k H_2 a jsou schopné oxidovat atmosférický H_2 (Constant et al., 2011).

3.5.3. [FeFe]-hydrogenázy

[FeFe]-hydrogenázy se vyskytují v různorodých organismech zahrnujících anaerobní prokaryota z domény Bacteria a také některá jednobuněčná eukaryota. Jiný typ hydrogenáz nebyl dosud u eukaryot popsán (Vignais & Billoud, 2007).

3.5.3.1. Struktura [FeFe]-hydrogenáz

Mnoho [FeFe]-hydrogenáz je monomerních a sestává pouze z katalytické podjednotky, nicméně dimerní, trimerní a tetramerní enzymy jsou známy také. Katalytické podjednotky jednotlivých [FeFe]-hydrogenáz se liší svou velikostí a kromě konzervovaných domén o délce cca 350 zbytků, které obsahují aktivní místo zvané H-klastr, často disponují dalšími doménami nesoucími Fe-S klastry (Vignais et al., 2001). H-klastr je jedinečná prostetická skupina, která může být rozdělena na dvě části. První část tvoří [4Fe-4S] klastr, druhá obsahuje FeFe centrum. Ligandem Fe²⁺ je molekula vody, kterou lze snadno vytěsnit, čímž se vytvoří katalytické místo (Peters, 1999). H-klastr je charakterizován třemi konzervovanými sekvenčními úseky, které obsahují pro katalýzu nezbytné cysteinové zbytky. Tyto úseky jsou zachyceny na obr. 4.



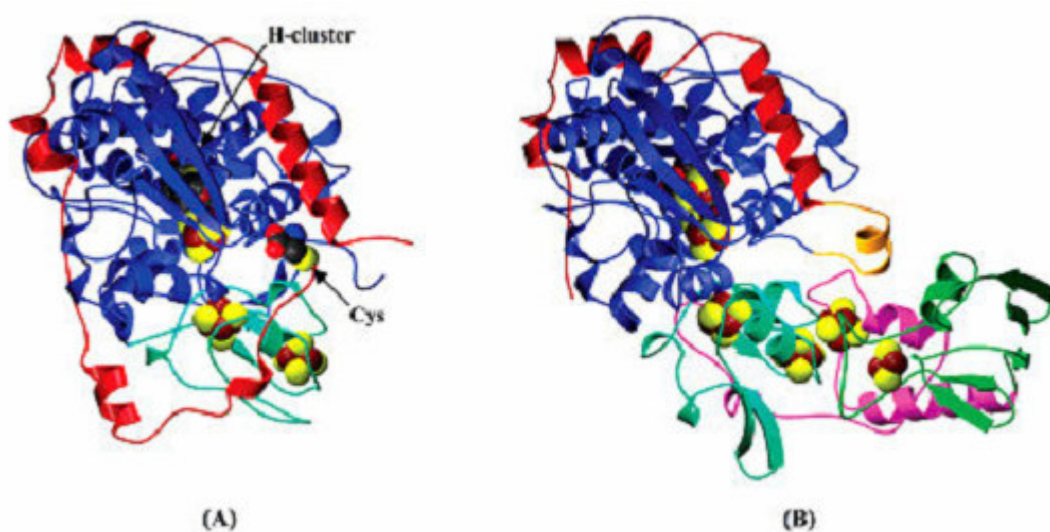
Obr. 4: Schématické zobrazení H-klastru. L1-L3 představují zmíněné konzervované úseky (převzato z Meyer, 2007).

Struktura heterodimerní [FeFe]-hydrogenázy byla dobře popsána u bakterie *Desulfovibrio desulfuricans*. Velká podjednotka má velikost 42 kDa, malá podjednotka má 11 kDa. Protein obsahuje tři [4Fe-4S] klastry, z nichž jeden je pomocí Cys-thiolátu propojen s binukleárním FeFe centrem, se kterým tvoří aktivní místo enzymu (H-klastr). Atomy Fe v binukleárním FeFe centru jsou spojeny dvěma thiolovými skupinami propan-1,3-dithiolu a jsou koordinovány CO a CN ligandy. Atom Fe²⁺ tohoto centra má jedno koordinační místo prázdné. Hluboko zanořené aktivní místo je s povrchem proteinu spojeno hydrofobním kanálem (Nicolet et al., 1999).

Monomerní [FeFe]-hydrogenáza byla popsána např. u bakterie *Clostridium pasteurianum*. Tato hydrogenáza má velikost cca 60 kDa a na rozdíl od výše zmíněné dimerní

hydrogenázy má navíc další [4Fe-4S] a [2Fe-2S] klastr, dohromady tedy disponuje pěti FeS klastry (Peters et al., 1998). Porovnání struktur obou hydrogenáz je na obr. 5.

Netypickou [FeFe]-hydrogenázou je tzv. bifurkační [FeFe]-hydrogenáza, která byla popsána u hypertermofilní bakterie *Thermotoga maritima*. Tato hydrogenáza se skládá ze tří rozdílných podjednotek. Podjednotka α o velikosti 73 kDa obsahuje H-klastr, tři [4Fe-4S] klastry a dva [2Fe-2S] klastry. Podjednotka β o velikosti 68 kDa obsahuje také tři [4Fe-4S] klastry, jeden [2Fe-2S] klastr a nese vazebná místa pro NAD^+ a FMN. Podjednotka γ má velikost 19 kDa a obsahuje pouze jeden [2Fe-2S] klastr (Verhagen et al., 1999; Shut & Adams, 2009).



Obr. 5: Struktura [FeFe]-hydrogenáz (A) *D. desulfuricans* a (B) *C. pasteurianum* (převzato z Fontecilla-Camps et al., 2007).

3.5.3.2. Funkce prokaryotických [FeFe]-hydrogenáz

[FeFe]-hydrogenázy jsou s ohledem na využití elektronových donorů a akceptorů velmi všestranné, nicméně se zdá, že výběr redoxních partnerů těchto hydrogenáz nijak nesouvisí s jejich odlišnou strukturou. [FeFe]-hydrogenázy se zpravidla podílejí na produkci H_2 (Vignais et al., 2001).

Z prokaryotických [FeFe]-hydrogenáz stojí za zmínku heterotrimerní bifurkační cytoplazmatická hydrogenáza bakterie *T. maritima*. Elektronová bifurkace založená na flavinech je proces, při němž je nízkoredoxpotenciální feredoxin redukován elektronovým donorem s vyšším potenciálem, jako např. NAD(P)H či H_2 . Tato endergonická reakce je poháněna současnou oxidací stejného elektronového donoru elektronovým akceptorem s vyšším potenciálem, jako např. NAD^+ či heterosulfidem. Tento proces je katalyzován

multienzymovými komplexy obsahujícími flavin, mezi něž patří i výše zmíněná hydrogenáza (Buckel & Thauer, 2013). Hydrogenáza *T. maritima* vyžaduje pro produkci H₂ přítomnost NADH a redukováného feredoxinu, a to v poměru 1:1 (Schut & Adams, 2009).

Ačkoliv bývají [FeFe]-hydrogenázy častěji spojovány s uvolňováním H₂, proteobakterie *Desulfovibrio vulgaris* má periplazmatickou [FeFe]-hydrogenázu, která H₂ pohlcuje. H₂ společně s laktátem slouží jako donor elektronů pro redukci sulfátu. Není vyloučené, že spotřebovávaný H₂ je produkován jinou hydrogenázou této bakterie (Pohorelic et al., 2002).

3.5.3.3. Funkce eukaryotických [FeFe]-hydrogenáz

[FeFe]-hydrogenázy byly identifikovány u zástupců některých skupin prvoků, zelených řas a několika anaerobních hub. Mezi řasami je dobře prostudovaná např. hydrogenáza *Chlamydomonas reinhardtii*, která je lokalizovaná ve stromatu chloroplastů. Za anaerobních podmínek [FeFe]-hydrogenázy zelených řas zprostředkovávají světlem poháněnou produkci H₂. Potřebné elektrony jsou dodávány přes plastochinon. Přirozeným donorem elektronů *C. reinhardtii* je feredoxin (Happe & Kaminski, 2002). Mezi jednobuněčnými, anaerobními houbami byla hydrogenáza identifikována např. u *Neocallimastix frontalis*, jejíž hydrogenáza je lokalizovaná v hydrogenosomu a produkuje vodík (Davidson et al., 2002).

Mezi prvoky lze hydrogenázy najít u různorodých zástupců. Hojně studované jsou hydrogenázy *T. vaginalis*, jimiž se zabývá i tato diplomová práce, a jejichž funkce byla popsána v kapitole 2.4. Kromě trichomonád byly hydrogenázy identifikovány u dalších anaerobních prvoků *G. intestinalis* a *E. histolytica*, jejichž hydrogenázy jsou cytosolické a produkují vodík (Nixon et al., 2004). Dalším organismem, u kterého byla hydrogenáza objevena, je anaerobní nálevník *Nyctotherus ovalis*, jehož hydrogenáza je lokalizovaná v hydrogenosomu a obsahuje dvě domény homologní k podjednotkám mitochondriálního komplexu I, které nesou dva FeS klastry a vazebná místa pro NADH a FMN, čímž umožňují přímou reoxidaci NADH (Boxma et al., 2007). V nedávné době byly také nově objeveny hydrogenázy v cytosolu volně žijící aerobní améby *Naegleria gruberi* (Tsaousis et al., 2014), v hydrogenosomu a cytosolu parazitické diplomonády *Spironucleus salmonicida* (Jarlström-Hultqvist et al., 2013), nebo ve volně žijící archamébě *Mastigamoeba balamuthi*, u které byly hydrogenázy lokalizovány také jak v hydrogenosomu, tak v cytosolu (Nývtová et al., 2013).

3.5.4. [Fe]-hydrogenázy

Jak již bylo zmíněno, mezi [Fe]-hydrogenázy spadá pouze H_2 -tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenáza (Hmd), která je přítomna pouze u některých metanogenních organismů (Vignais & Billoud, 2007).

3.5.4.1. Struktura [Fe]-hydrogenáz

Struktura Hmd byla popsána u *Methanocaldococcus jannaschii*. Hmd tvoří homodimer s podjednotkami o velikosti 38 kDa, z nichž každá obsahuje jeden atom Fe. Homodimer lze rozčlenit na dvě periferní oblasti s N-koncovými doménami a centrální část z propletených C-koncových polypeptidů obou podjednotek. Fe atom je koordinován dvěma molekulami CO, atomem síry cysteinového zbytku a atomem dusíku, který je součástí pyridinolu. Pátý ligand je neznámý, šesté koordinační místo je prázdné. Aktivní místo se nachází v mezeře mezi centrální a periferní jednotkou. Hmd na rozdíl od ostatních hydrogenáz neobsahuje žádné FeS klastry (Pilak et al., 2006; Shima et al., 2008).

3.5.4.2. Funkce [Fe]-hydrogenáz

Hmd byla extenzivně studována např. u *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Tato hydrogenáza využívá H_2 k reverzibilní redukci, N^5,N^{10} -metenyltetrahydrometanopterinu ($CH\equiv H_4MPT^+$) na N^5,N^{10} -methyltetrahydrometanopterin ($CH_2=H_4MPT$). Hmd se v buňce vyskytuje společně s F_{420} -dependentní metyltetrahydrometanopterin dehydrogenázou, která katalyzuje reakci v opačném směru s pomocí koenzymu F_{420} jako elektronového akceptoru. Oba enzymy jsou indukovány při nedostatku niklu, kdy nemůže být syntetizována F_{420} -redukující [NiFe]-hydrogenáza, jež katalyzuje redukci koenzymu F_{420} pomocí H_2 a v metanogenezi hraje důležitou roli (Afting et al., 1998).

4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem mé diplomové práce, kterou jsem zpracovávala na katedře parazitologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, bylo prokázat aktivitu hydrogenáz v cytosolu parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis* a určit, který protein je za ni zodpovědný.

Přítomnost hydrogenáz u *T. vaginalis* byla prozatím prokázána pouze v hydrogenosomu. Trichomonáda ve svém genomu kóduje deset homologů hydrogenáz, pouze pět jich však bylo nalezeno v proteomu hydrogenosomu, přičemž jeden z nich postrádá důležité konzervativní zbytky H-klastru a pravděpodobně hydrogenáza není. Funkce zbývajících homologů je neznámá, nicméně některé z nich obsahují charakteristický H-klastr a patrně tedy hydrogenázami jsou. Navíc neobsahují hydrogenosomální signální sekvenci, což poukazuje na jejich možnou cytosolickou lokalizaci. Nás tedy přirozeně zajímalo, jestli lze hydrogenázovou aktivitu u *T. vaginalis* zaznamenat i v cytosolu a v případě pozitivního nálezu zjistit, který protein může být za tuto aktivitu zodpovědný.

Ve své práci jsem se zabývala následujícími úkoly:

- 1) Stanovit a porovnat aktivitu hydrogenáz v hydrogenosomální a cytosolické frakci *T. vaginalis* pomocí spektrofotometrie a nativní elektroforézy.
- 2) Určit vhodného kandidáta pro cytosolickou hydrogenázu, overexprimovat ho v *T. vaginalis* a zjistit jeho lokalizaci v buňce.
- 3) Zjistit, jestli overexprimovaný protein má vliv na aktivitu hydrogenáz v jednotlivých frakcích.
- 4) Zjistit, jestli overexprese daného proteinu nějakým způsobem ovlivní expresi ostatních hydrogenázových homologů v *T. vaginalis*.

5. MATERIÁL A METODY

5.1. Použité organismy

5.1.1. *Trichomonas vaginalis*

Pro transfekci a měření enzymatických aktivit jsem používala *Trichomonas vaginalis*, kmen T1 (TvT1), (poskytl J. H. Tai, Institute of Biochemical Science, Taipei, Taiwan). Buňky jsem udržovala v axenické kultuře v médiu TYM pH 6,2 s agarem nebo bez agaru (Diamond, 1957) v 10ml zkumavkách při 37 °C. V závislosti na velikosti inokula byla kultura očkována do čerstvého média každých 24 až 48 hodin.

Transfekované linie jsem kultivovala v tomtéž médiu s přidaným selekčním antibiotikem geneticinem o konečné koncentraci 200 µg/ml. Kryostabiláty transfekovaných linií jsem dlouhodobě uchovávala v médiu TYM pH 6,2 s 5% dimetylsulfoxidem (Merck) v kapalném dusíku.

5.1.2. *Escherichia coli*

Pro transformaci a klonování jsem používala bakterie *E. coli*, kmen TOP10 nebo XL-1 Blue, které jsem kultivovala při 37 °C v LB médiu za třepání při 220 rpm. Pro selekci pozitivních klonů po transformaci na LB plotnách jsem používala roztok X-gal a příslušné antibiotikum, ampicilin (finální koncentrace 100 µg/ml) či kanamycin (finální koncentrace 50 µg/ml), dle použitého vektoru.

E. coli a její transformované linie jsem dlouhodobě uchovávala v LB médiu s 20% glycerolem zamražené v -80 °C.

5.2. Kultivace organismů

5.2.1. Kultivační média

Médium TYM (Diamond, 1957):

K ₂ HPO ₄ (Sigma).....	0,8 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma).....	0,8 g
kyselina askorbová (Sigma).....	0,2 g
L-cystein (Sigma).....	1 g
maltóza (Sigma).....	5 g
kvasničný autolyzát (Oxoid)	10 g
trypton (Oxoid).....	20 g
citrát železnato amonný	1 ml
agar.....	0,5 g
destilovaná voda	do 900 ml
inaktivované koňské sérum (Gibco ®).....	100 ml

Po navážení a rozpuštění všech složek (kromě agaru) v menším objemu vody upravit pH pomocí HCl na 6,2 a doplnit do 900 ml. Agar navážit přímo do lahve. Sterilizovat v autoklávu (120 °C, 20 minut). Po vychladnutí média přidat inaktivované koňské sérum (výsledná koncentrace 10 %). Koňské sérum je inaktivováno při 56 °C po dobu 30 minut.

LB médium:

LB médium (Sigma).....	20 g
destilovaná voda	do 500 ml

LB plotny:

LB agar.....	17 g
destilovaná voda	do 500 ml

SOC médium:

trypton	2 g
kvasničný autolyzát.....	0,5 g
NaCl	0,058 g
250 mM KCl	1 ml
destilovaná voda	do 100 ml
20% glukóza (sterilní)	1,8 ml
2M MgCl ₂ (sterilní).....	0,5 ml

Navážit trypton, autolyzát, NaCl a KCl a rozpustit v menším množství vody, pH upravit na hodnotu 7, doplnit do 100 ml a sterilizovat. Po vychladnutí přidat glukózu a MgCl₂ a rozplnit po 1 ml. Uchovávat v -20 °C.

5.2.2. Kultivační roztoky**Antibiotika:**

amikacin (Sigma).....	25 mg/ml
ampicilin (Sigma)	100 mg/ml
geneticin (G418) (Sigma)	20 mg/ml
kanamycin (Sigma)	50 mg/ml
penicilin (Biotika)	100 000 IU/ml

X-gal:

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid).....	100 mg
N,N'-dimethyl-formamid.....	2 ml

Uchováván v -20 °C obalený alobalem. Na LB plotnu je nanášeno 20 µl.

5.3. Použité pufry a roztoky**5.3.1. SDS-PAGE**

Pro analýzu vzorků pomocí SDS-PAGE byly použity standardní roztoky Laemmliho systému.

5.3.2. Western blotová analýza

Blotovací pufr:

10x koncentrovaný SDS pufr.....	100 ml
methanol.....	200 ml
destilovaná voda	700 ml

10x PBS:

NaCl	8 g
KCl.....	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ . 12 H ₂ O	1,53 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
destilovaná voda	do 1000 ml

Blokovací a promývací roztok:

nízkotučné sušené mléko (Laktino).....	10 g
Tween ® 20 (Sigma).....	500 µl
PBS.....	200 ml

Roztok barvy Ponceau S:

Ponceau S	0,5 %
ledová kyselina octová	1 %

Substrát pro alkalickou fosfatázu:

tablety Sigma Fast BCIP/NBT

5.3.3. Protilátky

Primární protilátky:

- anti-HA monoklonální protilátka (myš IgG), (Exbio)
- anti-5xHis monoklonální protilátka (myš IgG), (QiaGen)
- anti-ME polyklonální protilátka (králík), (Eurogentec)

Sekundární protilátky:

A. Western blotová analýza:

protilátka proti myššímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL)

B. Imunofluorescence

protilátka proti myšímu IgG značená ALEXA FLUOR 488 (Molecular Probes)

protilátka proti králičímu IgG značená ALEXA FLUOR 594 (Molecular Probes)

5.3.4. Imunofluorescence

2x PEM pufr:

PIPES.....30,2 g

0,5 M roztok EGTA 2 ml

1 M roztok MgSO₄.....100 µl

Smíchat a přikapávat koncentrovaný NaOH do vyčerpání, upravit pH na hodnotu 6,9. Doplnit do 500 ml vodou. Sterilizovat v autoklávu.

PEMBALG:

1x PEM pufr 200 ml

BSA.....2 g

lysin.....3,6 g

želatina (cold water fish skin gelatin, Sigma) 1 g

Ve sterilní 100ml lahvi rozpustit želatinu v cca 30 ml sterilní vody. Zahřát na 45 °C. Vychladit a přidat BSA a lysin. Rozpuštěné přelít do falkony a doplnit do 50 ml vodou. Přelít zpět do lahve, přidat 50 ml 2x PEM a zamrazit (-20 °C).

32% formaldehyd: od firmy EMS

5.3.5. Frakcionace trichomonád

ST pufr:

sacharóza 42,85 g

TRIS (Sigma) 0,6 g

KCl.....18,5 mg

destilovaná voda do 500 ml

Upravit pH na hodnotu 7,2 pomocí HCl a uchovávat v -20 °C.

Inhibitory proteáz:

tosyl-lysin-chlormetylketon (TLCK) 25 mg/ml

leupeptin 5 mg/ml

5.3.6. Nativní proteinová elektroforéza

Nativní elektrodový pufr:

TRIS.....	3,03 g
Glycin.....	14,4 g
destilovaná voda	do 1000 ml

Vyvolávací roztok pro histochemickou detekci hydrogenázy:

25mM glycinový pufr; pH 8,5.....	30 ml
mehylviologen (N,N'-dimetyl-4,4'bipiridinium, MV), (Sigma)	5 mg
trifenyltetrazolium (2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid, TPT), (Sigma).....	10 mg

Bublat čistým vodíkem cca 30 min.

Detergenty pro přípravu vzorků pro nativní elektroforézu:

10% Triton TX-100
50% oktylglukosid (n-octyl-beta-D-glukopyranosid)

5.3.7. Trypsinizace hydrogenosomů

Zásobní roztoky:

trypsin	5 mg/ml
TLCK	25 mg/ml
leupeptin.....	5 mg/ml
Triton TX-100.....	10%

5.3.8. Izolace His-tagovaného proteinu na Ni-NTA koloně

Promývací pufr:

TRIS.....	121,1 mg (20 mM)
NaCl	730 mg (250 mM)
FeSO ₄	3,5 mg (250 μM)
DTT	7,7 mg (1 mM)
imidazol.....	170 mg (50 mM)
destilovaná voda	do 50 ml

Upravit pH na hodnotu 8.

Eluční pufr:

TRIS	121,1 mg (20 mM)
NaCl	730 mg (250 mM)
FeSO ₄	3,5 mg (250 µM)
DTT	7,7 mg (1 mM)
imidazol	850 mg (250 mM)
destilovaná voda	do 50 ml

Upravit pH na hodnotu 8.

5.3.9. Biochemie**Pufr pro měření latence hydrogenosomů (IM pufr):**

sacharóza	77 g
KH ₂ PO ₄	1,36 g
TRIS	2,42 g
0,5 M MgCl ₂ . 6 H ₂ O	10 ml
0,1 M EDTA	10 ml
destilovaná voda	do 1000 ml

Upravit pH na hodnotu 7,2. Uchovávat v -20 °C.

Pufr pro měření hydrogenáz:

glycin	937,5 mg
destilovaná voda	do 500 ml

Upravit pH na hodnotu 8,5. Uchovávat v -20 °C.

Pufry pro měření pH optima hydrogenáz:

TRIS	302,8 mg
destilovaná voda	do 50 ml

Připravit pět roztoků o pH 7; 7,5; 8; 8,5 a 9. Uchovávat v -20 °C.

CHES	518,2 mg
destilovaná voda	do 50 ml

Připravit tři roztoky o pH 9; 9,5 a 10. Uchovávat v -20 °C.

CAPSO 553,3 mg
destilovaná voda.....do 50 ml

Připravit dva roztoky o pH 10 a 10,5. Uchovávat v -20 °C.

Zásobní roztoky pro měření aktivit enzymů:

1M L-malát
100 mM NAD
100 mM methylviologen
10% Triton TX-100

Všechny chemikálie byly ředěny destilovanou vodou.

5.4. Použité geny a proteiny

TVAG_452140: předpokládaná cytosolická FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: Fe dehydrogenáza, putativní)

TVAG_320010: předpokládaná cytosolická FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: Fe dehydrogenáza, putativní)

TVAG_136330: fúzní protein s hydrogenázovou doménou (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: sulfit reduktáza, putativní)

TVAG_483690: fúzní protein s hydrogenázovou doménou (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: NADPH/FAD oxidoreduktáza, putativní)

TVAG_447160: předpokládaná cytosolická FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR, overexpresi v *T. vaginalis*, biochemické studie)
(anotace z genomu: Fe dehydrogenáza, putativní)

TVAG_160930: hydrogenosomální homolog FeFe hydrogenáz (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: FeFe hydrogenáza, putativní)

TVAG_182620: hydrogenosomální FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: Fe dehydrogenáza, putativní)

TVAG_361590: hydrogenosomální FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: NADH-ubichinon oxidoreduktáza, putativní)

TVAG_310050: hydrogenosomální FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: Fe dehydrogenáza, putativní)

TVAG_037570: hydrogenosomální FeFe hydrogenáza (použit pro qRT-PCR)
(anotace z genomu: NADH-ubichinon oxidoreduktáza, putativní)

TVAG_181970: lehký řetězec axonemálního dyneinu (použit pro qRT-PCR)

5.5. Experimentální metody

5.5.1. Amplifikace genů

Pro amplifikaci genů jsem použila metodu PCR (Polymerase Chain Reaction). Pro amplifikaci všech genů jsem jako templát použila genomovou DNA *T. vaginalis*, kterou jsem izolovala pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

V primerech byly zahrnuty sekvence pro restrikční místa, které byly využity pro následné klonování.

Primery pro expresi proteinů v *T. vaginalis* (restrikční místa vyznačena tučně):

Cytosolická hydrogenáza TVAG_447160, restrikční místa NdeI , BamHI	
Forward	5'-CATATGCTTTCCATCAAGATTG-3'
Reverse	5'-GGATCCCTTAGCAACTTGTGGACT-3'

Cytosolická hydrogenáza TVAG_447160 s His-tagem, restrikční místa NdeI , BamHI	
Forward	5'-CATATGCTTTCCATCAAGATTG-3'
Reverse	5'-CGCGGATCCTTAGTGGTGATGGTGGTGGTGGTCTTAGCAACTTGTGGA CTGAAATGA-3'

PCR pro gen TVAG_447160 – 25 µl reakce (chemikálie Biolabs) obsahovala:

5x Q5 reaction buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
10 µM forward primer	1,25 µl
10 µM reverse primer	1,25 µl
genomová DNA	1 µl
Q5® High-fidelity DNA polymerase	0,25 µl
5x Q5 High GC enhancer	5 µl
sterilní H ₂ O	10,75 µl

Program PCR pro amplifikaci TVAG_447160:

1. 98 °C.....30 s
2. 98 °C.....10 s
3. 55 °C.....30 s
4. 72 °C.....60 s
5. 30x opakování kroků 2-4
6. 72 °C.....2 min.
7. 4 °C.....∞

5.5.2. Analýza vzorků DNA/RNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu

Vzorky DNA (po PCR, restričním štěpení, či izolaci plasmidu) jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarózovém gelu s barvivem SYBR® Safe (Invitrogen). Vzorek jsem nejdříve smíchala s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrům (Fermentas) a poté nanasla na gel. Elektroforéza probíhala za napětí 90-110 V. Jako standard pro porovnání velikosti DNA fragmentu jsem použila GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). DNA jsem vizualizovala pomocí UV transiluminátoru.

5.5.3. Extrakce DNA z agarózového gelu

Požadovaný band z agarózového gelu jsem vyřízla pomocí sterilního skalpelu. Poté jsem purifikovala DNA pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (250), (Qiagen).

5.5.4. Ligace do TOPO® vektoru

TOPO® vektor (Invitrogen) je plasmidový vektor používaný pro TA klonování produktů PCR. Selektivním antibiotikem je kanamycin. Ligační reakce o celkovém objemu 3 µl obsahovala:

- | | |
|--------------------|--------|
| PCR produkt..... | 2 µl |
| Salt solution..... | 0,5 µl |
| TOPO® vektor..... | 0,5 µl |

Ligační reakci jsem nechala inkubovat 45 minut při laboratorní teplotě.

5.5.5. Transformace *E. coli*

Bakterie *E. coli* jsem transformovala tepelným šokem 45 sekund při 42 °C a nechala jsem je stát 2 minuty na ledu. Poté jsem přidala 250 µl SOC média předeřátého na 37 °C a bakterie jsem inkubovala na třepačce při 220 RPM a 37 °C po dobu 1 hodiny. Následně jsem bakterie vysela na LB agarové plotny s 20 µl X-Galu a příslušným antibiotikem, ampicilinem

(finální koncentrace 100 µg/ml) či kanamycinem (finální koncentrace 50 µg/ml), dle použitého vektoru. Plotny s vyšetými bakteriemi jsem inkubovala přes noc při 37 °C.

5.5.6. DNA Miniprep

Plasmid se zaligovaným genem jsem izolovala ze 4 ml bakteriální kultury pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

5.5.7. Štěpení TOPO® vektoru

Plasmid s příslušným genem jsem štěpila specifickými restriktázami v reakci o celkovém objemu 20 µl:

10x FastDigest® Green buffer	2 µl
plasmid	10 µl
restriktáza BamHI	0,5 µl
restriktáza NdeI.....	0,5 µl
sterilní voda	7 µl

Restrikční směs jsem promíchala a nechala inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Vzorek jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy na 1% agaróze.

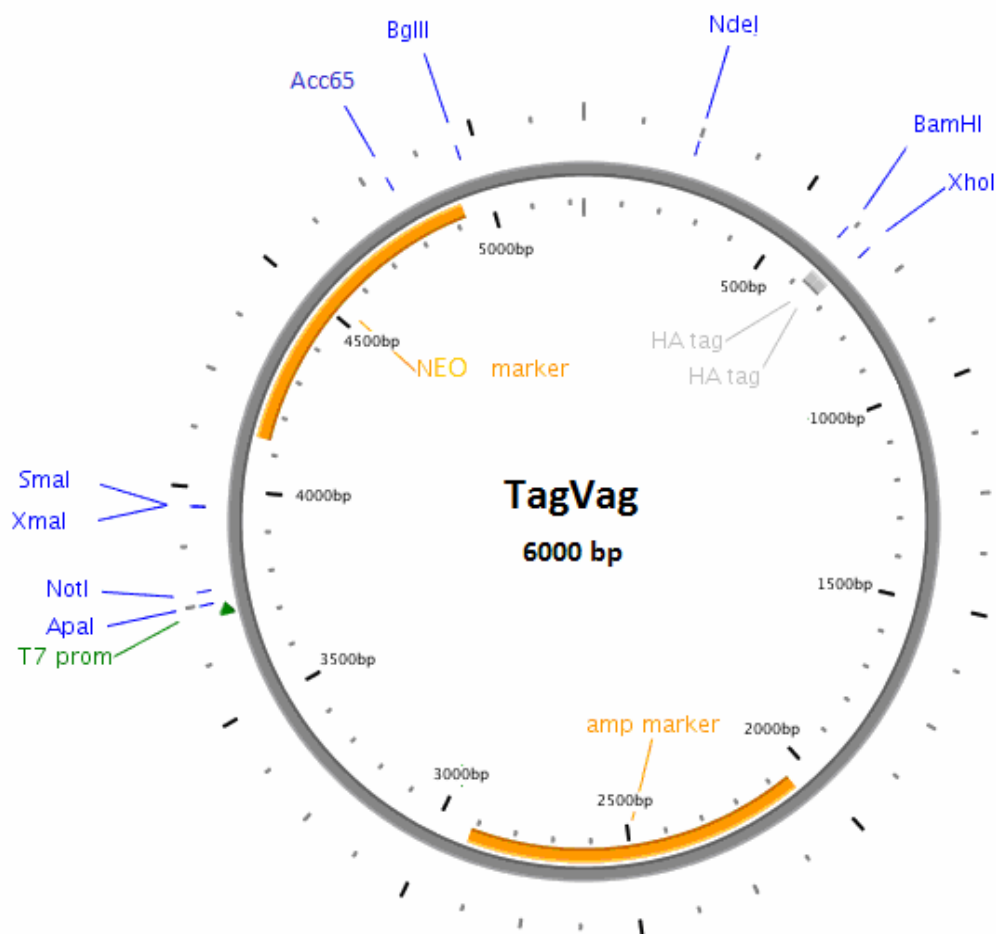
5.5.8. Ligace do vektoru TagVag

Vektor TagVag je plasmidový vektor určený pro expresi proteinů v trichomonádách. Obsahuje T7 promotor, gen pro rezistenci k ampicilinu pro selekci v bakteriích, gen pro rezistenci ke geneticinu pro selekci v trichomonádách a hemaglutinivé značení. Mapa vektroou je znázorněna na obr. 6. Já jsem pro štěpení použila restrikní místa NdeI a BamHI.

Ligační reakce o celkovém objemu 10 µl obsahovala:

10x T4 DNA ligační pufr	1 µl
TagVag vektor.....	2 µl
insert.....	6 µl
T4 DNA ligáza	1 µl

Reakční směs jsem promíchala a nechala ji inkubovat přes noc při 15 °C. Druhý den jsem provedla transformaci *E. coli*.



Obr. 6: Mapa expresního plasmidu TagVag. T7 prom, T7 promotor; amp marker, gen pro rezistenci k ampicilinu; NEO marker, gen pro rezistenci ke geneticinu; HA tag, hemagglutininové značení; modře jsou vyznačena restrikční místa (Delgadillo et al., 1997).

5.5.9. SDS proteinová elektroforéza

Proteiny byly separovány podle jejich molekulové hmotnosti standardní vertikální elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Před nanesením vzorku na elektroforézu (Mini Protean II, Bio-Rad) jsem vzorky smíchala s SDS-PAGE vzorkovým puřem a denaturovala je ve vodní lázni 5 minut při 100 °C. Pro určení relativní molekulové hmotnosti byl použit standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). Po elektroforéze byly proteiny vizualizovány obarvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), případně následovala Western blotová analýza.

5.5.10. Western blotová analýza

Gel získaný SDS-PAGE jsem přeblotovala na nitrocelulózovou membránu při proudu 1,5 mA/cm² membrány po dobu 1 hodiny a 10 minut. Po skončení blotování jsem membránu

obarvila roztokem Ponceau S pro vizualizaci proteinů, a poté jsem ji promyla destilovanou vodou. Pro Western blotovou analýzu jsem použila polosuchý blot (Biometra) a zdroj Bio-Rad.

5.5.11. Imunodetekce proteinu na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózovou membránu s přeblovaným vzorkem jsem inkubovala přes noc v lednici v blokovacím pufru. Druhý den jsem membránu inkubovala v blokovacím pufru s primární protilátkou (pro výčet protilátek viz kapitola 5.3.3.) po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Poté jsem membránu promyla 3x 15 minut v blokovacím pufru a membránu inkubovala 1 hodinu v blokovacím pufru se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Následně jsem membránu opět promyla 2x 15 minut v blokovacím pufru a 1x v PBS. Takto promytou membránu jsem inkubovala se substrátem pro alkalickou fosfatázu, který vizualizoval označené proteiny.

5.5.12. DNA Midiprep

K izolaci dostatečného množství rekombinantních plasmidů pro transformaci buněk *T. vaginalis* jsem použila kit Wizard® Plus Midipreps (Promega). Koncentraci izolované DNA jsem změřila na nanodropu (NanoDrop ND - 1000 Spectrophotometer).

5.5.13. Transfekce *T. vaginalis* elektroporací

Pro transfekci trichomonád jsem si napěstovala 250 ml kultury TvT1, kterou jsem sterilně stočila při 1000 x g/10 minut/4 °C. Po celou dobu jsem udržovala buňky na ledu. Pelet jsem zvážila a na každý gram jsem přidala 0,5 ml média TYM 6,2 bez agaru. Suspenzi trichomonád jsem opatrně 3 x resuspendovala přes G 23 jehlu. Do 4mm kyvety (4 MM Gene pulser Cuvette, Biorad) jsem napipetovala 300 µl buněk a přidala 50 µg rekombinantního plasmidu. Trichomonády jsem elektroporovala při časové konstantě 175 ms a napětí 350 V (elektroporátor GenePulser Xcell, Bio-Rad). Poté jsem buňky ihned přenesla do média TYM 6,2 bez agaru s amikacinem (250 µg/ml) a penicilinem (1000 IU/ml) vytemperovaného na 37 °C. Po 4 hodinách kultivace při 37 °C jsem do média s trichomonádami přidala geneticin o výsledné koncentraci 200 µg/ml. Ve chvíli, kdy byla transfekovaná kultura trichomonád dobře narostlá (trvá i několik dní), jsem udělala pasáž do čerstvého média TYM 6,2 s agarem či bez agaru a s geneticinem (200 µg/ml), který posloužil pro selekci pozitivních transformantů.

5.5.14. Příprava preparátů na imunofluorescenci

Buňky trichomonád jsem fixovala přímo v kultuře 1% formaldehydem po dobu 30 minut, do 10 ml buněčné kultury jsem přidala 312 μ l 32% formaldehydu. Poté jsem buňky stočila při 900 x g/5 minut. Médium jsem odsála a pelet jsem promyla 5 ml 1x PEM pufru a opět stočila. Promytý pelet buněk jsem opatrně resuspendovala plastovou pastérkou v příslušném množství 1x PEM pufru (na jedno sklíčko je potřeba 100-150 μ l buněk). Příslušné množství buněk jsem plastovou pasteurkou kápala na silanizované sklíčko, kapku jsem opatrně roztáhla a buňky jsem nechala sednout po dobu 30 minut. Přebytek buněk jsem odsála, zbylé buňky jsem nechala úplně zaschnout a na sklíčko jsem opatrně nakapala 1 ml 0,1% Tritonu TX100 v 1x PEM pufru. Buňky jsem permeabilizovala 10 minut. Poté jsem Triton odsála a buňky jsem promývala 3x 5 minut v 1x PEM. Následně jsem preparáty blokovala v 0,5 ml roztoku PEMBALG po dobu 30 minut. Poté jsem preparáty inkubovala 1 hodinu s primární protilátkou naředěnou v 250 μ l PEMBALG. Po inkubaci jsem preparáty promyla 3x v 1 ml 1x PEM, a to po dobu 5, 10 a naposledy 15 minut. Po promytí jsem na sklíčka nanasla sekundární protilátku naředěnou opět v 250 μ l PEMBALG a nechala inkubovat 1 hodinu. Poté jsem preparáty znovu 3x promyla v 1 ml 1x PEM po dobu 5, 10 a 15 minut. Nakonec jsem na promyté podložní sklo kápala Vectashield s DAPI a preparát jsem překryla krycím sklíčkem, které jsem zafixovala lakem na nehty. Takto připravené preparáty jsem prohlížela pod fluorescenčním mikroskopem.

5.5.15. Frakcionace trichomonád

Homogenizace buněk

Narostlou kulturu *T. vaginalis* o objemu 1 l jsem stočila na centrifuze při 2500 x g/15 min./4 °C. Supernatant jsem slila a pelet jsem resuspendovala v PBS, přenesla do 50ml centrifugační zkumavky a stočila při 1000 x g/10 min./4 °C. Supernatant jsem opět slila a promývání v PBS jsem zopakovala ještě jednou. Při třetím promývání jsem pelet resuspendovala v 50 ml ST pufru. Po promytí v ST pufru jsem pelet buněk resuspendovala ve 25 ml ST pufru předem probublaného dusíkem a přidala jsem inhibitory proteáz TLCK (50 μ g/ml) a leupeptin (10 μ g/ml). Následně jsem buňky homogenizovala sonikací na ledu (sonikátor Vibra Cell) při amplitudě 40, 1s impulsech, v minutových intervalech, dokud nebyly téměř všechny buňky rozbité. Po každém intervalu jsem buňky promíchala a zkontrolovala pod mikroskopem.

Diferenciální centrifugace

Homogenát jsem stočila při 800 x g/10 min./4 °C, sedimentu (obsahuje nerozbité buňky, membrány, jádra) jsem se zbavila, supernatant jsem přenesla do nové centrifugační zkumavky a následně jsem ho stočila při 9000 x g/20 min./4 °C. Pelet obsahuje LGF (Large Granular Fraction) obohacenou buněčnými organelami, lysozomy a hydrogenosomy. Supernatant obsahuje hrubou cytoplasmu. Z peletu jsem odsála bílé lysozomy a hydrogenosomy jsem promyla ve 2 ml ST pufru s inhibitory a stočila jsem je při 20 000 x g/20 min./4 °C. Opět jsem odsála zbytky lysozomů, a tím jsem získala frakci dostatečně čistých hydrogenosomů. Hrubou cytoplasmu jsem stočila při 40 000 x g/20 min./4 °C, čímž jsem získala čistou cytoplasmu. Homogenát, hydrogenosomy i cytoplasmu jsem po celou dobu izolace držela na ledu. Dlouhodobě se všechny frakce skladují v -80 °C.

5.5.16. Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho

Množství proteinů ve vzorcích jsem stanovovala metodou podle Lowryho (Lowry et al., 1951) s použitím roztoku BSA (1 mg/ml) jako proteinového standardu.

Všechny vzorky jsem měřila v duplikátech. Kalibrační křivka sestávala z 0, 5, 10, 25, 50 a 75 µl BSA standardu. Testované vzorky jsem napipetovala do kyvet a doplnila jsem je destilovanou vodou do 0,5 ml. Dále jsem ke každému přidala 2,5 ml roztoku D a nechala inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Poté jsem ke vzorkům přidala 0,25 ml roztoku C, dobře jsem je promíchala a nechala stát ve tmě při pokojové teplotě 30-60 minut. Následně jsem změřila absorbanci jednotlivých vzorků při 670 nm.

5.5.17. Nativní proteinová elektroforéza

Nativní proteinová elektroforéza funguje na stejném principu jako klasická SDS-PAGE, rozdíl je v tom, že do žádné z komponent (pufr, gel, vzorkový pufr) se nepřidává SDS. Pro nativní elektroforézu jsem používala 8% nativní gel s 1% Tritonem TX-100. Elektroforézu (Mini Protean II, Bio-Rad) jsem po celou dobu běhu chladila na ledu.

Vzorky pro analýzu jsem připravovala následovně:

- A. cytosolická frakce: 100 µl cytosolu + 20 µl 5x nativního vzorkového pufru + 1,2 µl 10% Tritonu TX-100
- B. hydrogenosomální frakce: 50 µl hydrogenosomů + 5 µl 5x nativního vzorkového pufru + 10 µl 50% oktylglukosidu

Proteiny (hydrogenázy) byly po elektroforéze vizualizovány přímo v gelu pomocí histochemického barvení v glycinovém pufru s MV a TPT (viz kapitola 5.3.6.), který byl předem nasycen vodíkem.

5.5.18. Trypsinizace hydrogenosomů

Pro trypsinizaci jsem použila purifikované hydrogenosomy získané frakcionací transfekovaných trichomonád. Cílem tohoto pokusu je určit, zda studovaný protein je lokalizovaný uvnitř hydrogenosomu či je asociovaný s jeho vnějším povrchem.

Zvážený pelet hydrogenosomů jsem rozdělila na tři alikvóty po 5 mg. Připravené alikvóty jsem rozsuspendovala v 0,5 ml ST pufru s přidanými inhibitory proteáz TLCK (50 µg/ml) a leupeptinem (10 µg/ml). K jednomu alikvótu jsem přidala trypsin (200 µg/ml), ke druhému jsem přidala trypsin (200 µg/ml) a 1% Triton TX-100, ke třetímu jsem nepřidávala nic. První a druhý alikvót jsem inkubovala ve vodní lázni 30 minut při 37 °C. Třetí alikvót jsem držela na ledu. Po půl hodině jsem všechny vzorky stočila při 20 000 x g/5 min./4 °C.

Stočený pelet jsem resuspendovala v 60 µl 1x SDS-PAGE vzorkového pufru a denaturovala je ve vodní lázni 5 minut při 100 °C. Analýzu vzorků jsem provedla pomocí SDS-PAGE.

5.5.19. Izolace His-tagovaného proteinu na Ni-NTA agarózové koloně

Hydrogenázu označenou His-tagem jsem izolovala z cytosolu získaného frakcionací transfekovaných trichomonád.

K vyizolované cytosolické frakci jsem přidala v příslušném množství NaCl (250 mM), FeSO₄ (250 µM) a DTT (1 mM). Připravenou suspenzi jsem nalila na Ni-NTA agarózovou kolonu o objemu 600 µl a nechala prokapat, flowthrough jsem jímala do falkony. Následně jsem kolonku prokapala 5x 1 ml promývacího pufru a 4x 1 ml elučního pufru. Jednotlivé frakce jsem jímala do připravených 1,5ml mikrozkrumavek.

Ve všech frakcích včetně původního cytosolu jsem pak pomocí spektrofotometru měřila aktivitu hydrogenáz. Kromě toho jsem si z jednotlivých frakcí připravila vzorky pro analýzu pomocí SDS-PAGE tak, že jsem ke 20 µl frakce přidala 5 µl 5x SDS-PAGE vzorkového pufru a denaturovala je ve vodní lázni 5 minut při 100 °C.

5.5.20. Stanovení latence hydrogenosomů

Latence hydrogenosomů (tzn. stav hydrogenosomální membrány, vysoká latence indikuje neporušenost membrány organel) se měří pomocí aktivity jablečného enzymu, který

katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát a CO₂ s využitím NAD⁺ jako akceptoru elektronů (membrána hydrogenosomu je špatně propustná pro NAD). K měření jsem potřebovala následující komponenty:

IM pufr	2 ml
100 mM NAD ⁺	20 µl
hydrogenosomy	5 µl
1 M malát	40 µl
10% Triton TX-100	10 µl

Do měřicí kyvety jsem nejprve napipetovala IM pufr, NAD⁺ a hydrogenosomy. Směs jsem promíchala, umístila do spektrofotometru a změřila při 340 nm. Poté jsem do kyvety přidala malát, promíchala a zaznamenala změnu absorbance v průběhu cca 2 minut. Nakonec jsem přidala Triton TX-100, opět promíchala a změřila absorbanci. Při vysoké latenci hydrogenosomů by po přidání malátu měla být měřitelná pouze nepatrná aktivita jablečného enzymu a většina aktivity by se měla objevit až po přidání Tritonu.

Výslednou latenci jsem zjistila tak, že jsem stanovila aktivitu jablečného enzymu v čase před přidáním Tritonu (Abs-TX) a po přidání Tritonu (Abs+TX) a hodnoty jsem dosadila do následující rovnice:

$$100 - (100 / \text{Abs+TX} \cdot \text{Abs-TX}) = \text{latence } [\%]$$

5.5.21. Spektrofotometrické stanovení hydrogenázových aktivit

Aktivity hydrogenáz v hydrogenosomální a cytosolické frakci jsem měřila anaerobně ve speciálních kyvetách se dvěma ramínky, přičemž k měření bylo potřeba následujících komponent:

25mM glycinový pufr; pH 8,5	2 ml
100mM methylviologen (MV)	20 µl
10% Triton TX100	5 µl (pro hydrogenosomy)
měřený vzorek	dle koncentrace proteinů

Do hlavního prostoru kyvety jsem vždy napipetovala pufr a MV, do jednoho ramínka měřený vzorek (cytosol, hydrogenosomy) v množství dle zvyklosti a v případě

hydrogenosomů do druhého ramínka ještě Triton. Pufr jsem vždy před zahájením měření nechala alespoň hodinu probublát vodíkem, stejně tak obsah kyvety jsem těsně před měřením konkrétního vzorku ještě 5 minut probublala. Po probublání jsem všechny komponenty v anaerobní kyvetě smíchala a ihned změřila při 600 nm.

Pro výpočet specifické aktivity (SA) hydrogenáz jsem použila následující vzorec:

$$SA = \Delta A \cdot V / \epsilon_{\lambda} \cdot p \cdot v \text{ [}\mu\text{mol/min/mg proteinu]}$$

ΔA změna absorbance za min

V objem reakční směsi v kyvetě

p množství proteinu v měřeném vzorku [mg/ml]

v objem vzorku s proteinem

ϵ_{λ} molární extinkční koeficient pro danou vlnovou délku

λ vlnová délka [nm]

$$\epsilon_{600} \text{ (MV)} = 13,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

5.5.22. Izolace RNA Trizolem

Celkovou RNA jsem z buněk trichomonád izolovala pomocí TRIZOLu (Total RNA Isolation Reagent, Gibco BRL). Pro izolaci RNA jsem použila dvě pěkně narostlé zkumavky trichomonád TvT1 (cca 20 ml).

Buňky pro izolaci jsem stáčela sterilně při 1500 x g/15 min./4 °C. Po stočení jsem pelet ještě promyla ve sterilním PBS a převedla ho do sterilní 1,5ml mikrozkušavky. Pelet jsem resuspendovala v 1 ml Trizol Reagent a směs jsem inkubovala 5 min. při pokojové teplotě. Poté jsem do reakce přidala 200 μ l chloroformu, směs jsem krátce promíchala otáčením v ruce, čímž mi vznikla bílo-růžová suspenze, kterou jsem inkubovala 3 min. při laboratorní teplotě. Následně jsem směs stočila při 11 500 x g/ 15 min./4°C.

Při centrifugaci se oddělila spodní červená fáze (DNA), interfáze (proteiny) a vrchní bezbarvá vodní fáze (RNA). Vrchní bezbarvou fází s RNA jsem přenesla do čisté mikrozkušavky, přidala jsem 500 μ l isopropanolu a promíchala. Směs jsem inkubovala 30-60 min. při laboratorní teplotě. Poté jsem ji stočila při 11 500 x g/15 min./4 °C.

Sražený RNA precipitát vytvořil na dně pelet. Supernatant jsem opatrně odsála a pelet jsem promyla v 1 ml 75% etanolu. Vzorek jsem stočila při 7 500 x g/5 min./4 °C.

Etanol jsem opatrně odsála, pelet jsem sušila na vzduchu 30-60 min. a poté jsem ho rozpustila v 50 µl sterilní přehřáté vody bez RNáz. Při rozpouštění jsem vzorek inkubovala 5-10 min. při 55 °C.

5.5.23. Přepis RNA do cDNA

Z vyizolované RNA jsem připravila cDNA reverzní transkripcí pomocí SuperScript™ Reverse Transcriptase III (Invitrogen). RNA jsem smíchala s 1 µl Oligo (dT) primerem (Promega) a s 1 µl 10 mM dNTP. Směs jsem inkubovala 5 minut při 65 °C, poté jsem ji zchladila na ledu a krátce stočila na centrifuze. Následně jsem přidala 4 µl FS pufru, 2 µl 0,1 M DTT a 1 µl Rnasin (Promega). Směs jsem promíchala a inkubovala 2 minuty při 42 °C. Poté jsem přidala 1 µl Superscriptu III, směs jsem inkubovala 50 minut při 42 °C a dále ještě 15 minut při 70 °C. Po skončení inkubace jsem odebrala kontrolní vzorek pro PCR.

5.5.24. qRT-PCR

Primery pro qRT-PCR:

TVAG_452140 (154 bp)	
Forward	5'-GGCCAAGACGCTTATGTTAGAA-3'
Reverse	5'-GACGTTGGAGTGATGAGCCA-3'

TVAG_320010 (140 bp)	
Forward	5'-AGAGGCTTCTGGTGGTGGT-3'
Reverse	5'-CACCACTTGCAACACCTCGA-3'

TVAG_136330 (121 bp)	
Forward	5'-CCACAGAAGCACATGGATGATA-3'
Reverse	5'-CGAGGAATGGAGTGTCTTTCTT-3'

TVAG_483690 (163 bp)	
Forward	5'-GACAGACCCACTCCACACAA-3'
Reverse	5'-GACGATGGGCAAAGTGTGGA-3'

TVAG_447160 (111 bp)	
Forward	5'-TCAGAACTCCATTACAAGGCCA-3'
Reverse	5'-AGCTGTATGGTCACTGTCCAAA-3'

TVAG_160930 (157 bp)	
Forward	5'-CGCGCTAACTCATTCTCGAGA-3'
Reverse	5'-GGCCGCATTCGTCACCTT-3'

TVAG_182620 (138 bp)	
Forward	5'-CTCCTCCAACGTCTCAACGA-3'
Reverse	5'-CATACCAATTGGAGAACGGCA-3'

TVAG_361590 (136 bp)	
Forward	5'-GACGGACACAAGGAAACAGACA-3'
Reverse	5'-GACCAGCACCAGAACCGAAA-3'

TVAG_310050 (122 bp)	
Forward	5'-CCGAAAAGGGCATCAAGGTT-3'
Reverse	5'-GTCATCCTGTCCCTGTTTCGAT-3'

TVAG_037570 (137 bp)	
Forward	5'-GCCAAAGAACAGAGTCTCTCTT-3'
Reverse	5'-GTGAATTTGGTTTGCCGAGGAA-3'

Dynein LC, TVAG_181970 (152 bp)	
Forward	5'-AACAGATGCAGTTCGCTCAA-3'
Reverse	5'-CGAATTTGTAGGCTGGGAA-3'

Složení reakce (10 µl):

sterilní H₂O 3,8 µl
iQ™ SYBR ® Green Supermix (Bio-Rad).....5 µl
forward primer 0,4 µl
reverse primer 0,4 µl
cDNA 0,4 µl

Program qRT-PCR (Roche cycder LC480):

1. 95 °C.....10 min.
2. 95 °C.....10 s
3. 59 °C.....12 s
4. 72 °C.....30 s
5. 50x opakování kroků 2-4
6. 97 °C.....10 s
7. 65 °C.....1 min.
8. 97 °C.....10 s
9. 40 °C.....10 min.

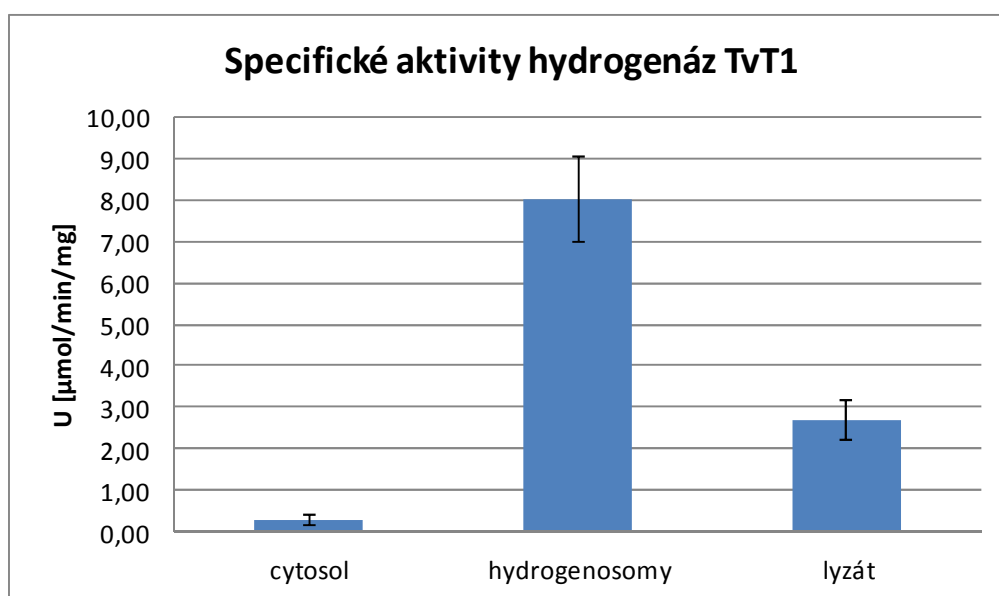
Relativní míru transkripce jsem počítala z hodnot C_p a výsledky jsem vyhodnocovala v programu Microsoft Excel. K měření jsem vždy použila alespoň dvě nezávisle izolované RNA a dva technické replikáty.

6. VÝSLEDKY

6.1. Průkaz aktivit hydrogenáz v cytosolické frakci *T. vaginalis*

6.1.1. Aktivity hydrogenáz naměřené spektrofotometricky

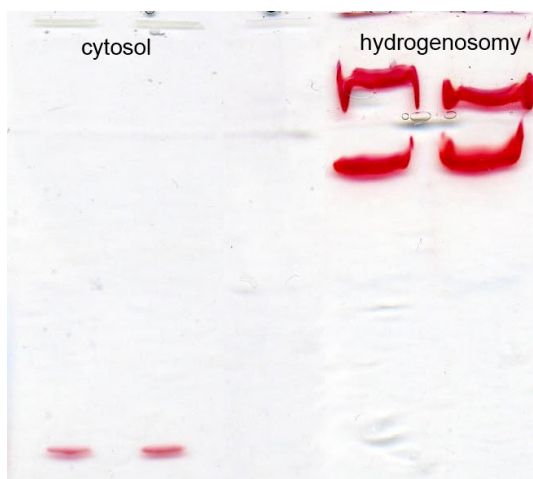
Nejdříve jsme potřebovali potvrdit naši hypotézu, že v cytosolu *T. vaginalis* je fyziologicky přítomna hydrogenázová aktivita, která není pouze výsledkem úniku hydrogenázy z hydrogenosomů s poškozenou membránou. Aktivity jsem měřila spektrofotometricky v lyzátu, hydrogenosomech a cytosolu *T. vaginalis* kmene T1 (TvT1) získaných pomocí diferenciální centrifugace. Aktivity jsem detekovala ve všech frakcích, jak je vidět v grafu 1.



Graf 1: Specifické aktivity hydrogenáz *T. vaginalis* v cytosolu, hydrogenosomech a lyzátu. Hodnoty jsou průměry ze 3 měření + SD.

6.1.2. Aktivity hydrogenáz detekované v gelu po nativní elektroforéze

Kromě spektrofotometrického měření jsem hydrogenázovou aktivitu prokazovala také pomocí nativní elektroforézy. Na obr. 7 je pomocí MV a TPT vizualizována aktivita hydrogenáz v cytosolu a hydrogenosomech na nativním gelu, na kterém je patrná rozdílná mobilita a intenzita aktivit hydrogenáz v jednotlivých frakcích.

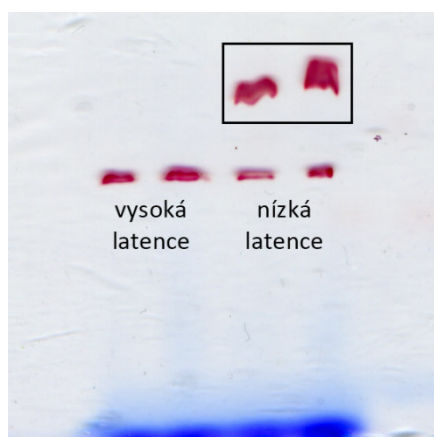


Obr. 7: Nativní, histochemicky barvený gel s viditelnými aktivitami hydrogenáz v cytosolu a hydrogenosomech *T. vaginalis*. Na elektroforézu bylo naneseno cca 150 µg cytosolické frakce a cca 90 µg hydrogenosomální frakce.

6.1.3. Vliv porušení latence hydrogenosomů na aktivitu hydrogenáz v jednotlivých buněčných frakcích

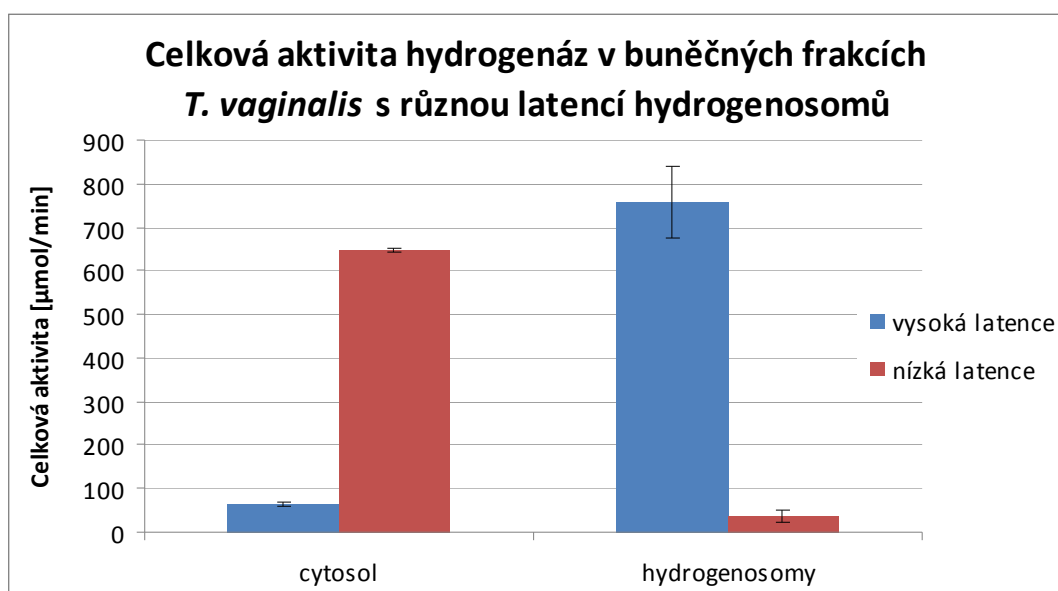
Abychom vyvrátili možnost, že aktivita, kterou v cytosolu naměříme, je původem z hydrogenosomů, měřila jsem pokaždé kromě samotných aktivit také latenci hydrogenosomů, jak je popsána v kapitole 5.5.20. Latence ve všech případech vycházela cca 95 %, což znamená, že únik enzymů (aktivit) z hydrogenosomální matrix je velmi nepravděpodobný.

Nicméně jsme chtěli zjistit, co se s cytosolickou hydrogenázovou aktivitou stane, když latenci hydrogenosomů úmyslně narušíme. Latenci hydrogenosomů jsem narušila tak, že jsem sonikací získaný lyzát buněk opakovaně zmrazila v tekutém dusíku a opět rychle rozmrazila ve vodní lázni při 37 °C. Dále jsem pokračovala frakcionací trichomonád jako obvykle. Na nativní elektroforéze jsem posléze pomocí histochemického barvení porovnála aktivitu hydrogenáz v cytosolu získaném diferenciací lyzátu s latentními hydrogenosomy a lyzátu s hydrogenosomy s porušenou latencí. Latence hydrogenosomů ze zmrazovaného lyzátu byla pouze 24 %. Na obr. 8 je vidět, že ve druhém cytosolu se navíc objevil další band, který může poukazovat na přítomnost hydrogenáz uniklých z porušených hydrogenosomů.



Obr. 8: Nativní, histochemicky barvený gel s viditelnými aktivitami hydrogenáz v cytosolu získaném diferenciální centrifugací lyzátu s latentními hydrogenosomy (vysoká latence) a lyzátu s hydrogenosomy s porušenou latencí (nízká latence). V černém rámečku jsou bandy označující aktivitu hydrogenáz, kterou považujeme za uniklou z hydrogenosomů. Na elektroforézu bylo naneseno cca 120 μg frakce s vysokou latencí a cca 200 μg frakce s nízkou latencí.

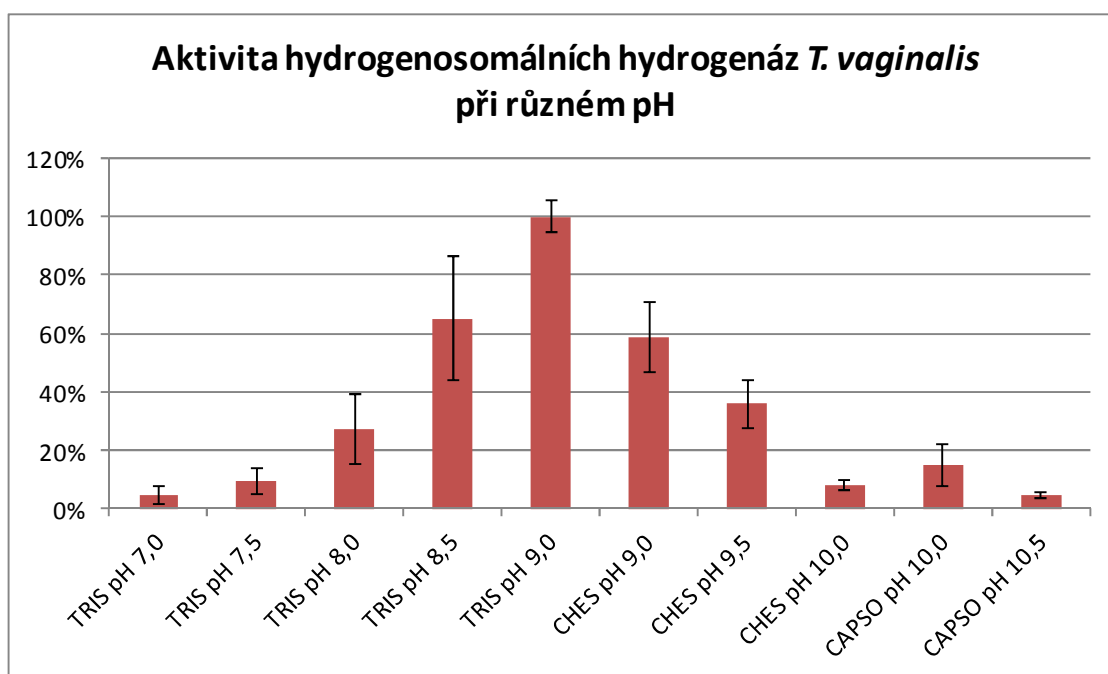
Narušená latence hydrogenosomů se samozřejmě projevila také při spektrofotometrickém měření aktivit hydrogenáz. V grafu 2 je vidět poměrné porovnání aktivit hydrogenáz cytosolických a hydrogenosomálních frakcí získaných diferenciální centrifugací standardně připraveného a zmražovaného lyzátu.



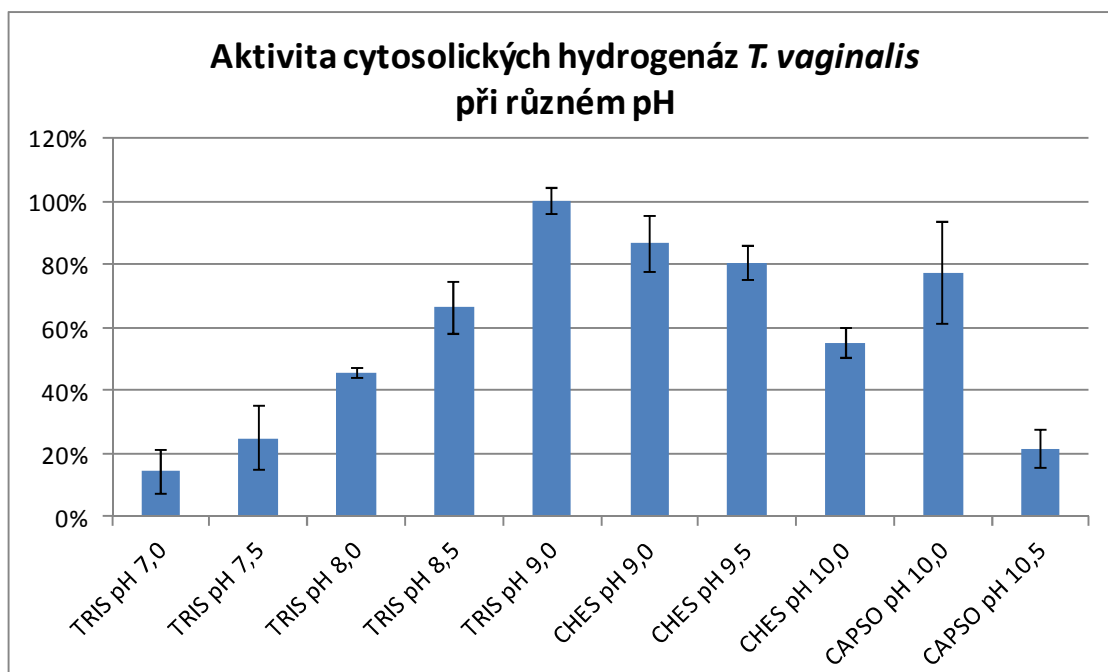
Graf 2: Porovnání celkových aktivit hydrogenáz *T. vaginalis* v cytosolu a hydrogenosomech získaných diferenciální centrifugací lyzátu s latentními hydrogenosomy (vysoká latence) a lyzátu s hydrogenosomy s porušenou latencí (nízká latence). Celková aktivita je aktivita hydrogenáz v celé izolované frakci, tj. v 1 ml hydrogenosomů a 7 ml cytosolu. Hodnoty jsou průměr ze 3 měření $\pm$ SD.

6.1.4. Stanovení pH optima pro aktivitu hydrogenáz v hydrogenosomální a cytosolické frakci

Aktivity hydrogenáz standardně měřím v 25mM glycinovém pufru o pH 8,5. My jsme chtěli zjistit, zda se aktivita hydrogenáz v cytosolu a hydrogenosomu bude lišit v závislosti na pH použitého pufru. Rozdíl v pH optimech by naznačoval přítomnost rozdílných enzymů v cytoplasmě a v hydrogenosomech. Pro měření aktivit hydrogenáz za různých pH podmínek jsem použila pufrы uvedené v kapitole 5.3.9. Graf 3 ukazuje procentuální aktivity hydrogenosomálních hydrogenáz v rozpětí pH od 7,0 do 10,5. V grafu 4 je ve stejném rozmezí pH zaznamenána procentuální aktivita cytosolických hydrogenáz. Při porovnání obou grafů se zdá, že pH optimum hydrogenáz v obou frakcích je stejné, nicméně cytosolické hydrogenázy jsou relativně více aktivní v pufrech s alkalickým pH.



Graf 3: Porovnání aktivit hydrogenosomálních hydrogenáz wild-type *T. vaginalis* při různém pH. Hodnoty jsou průměr ze 3 měření $\pm$ SD.



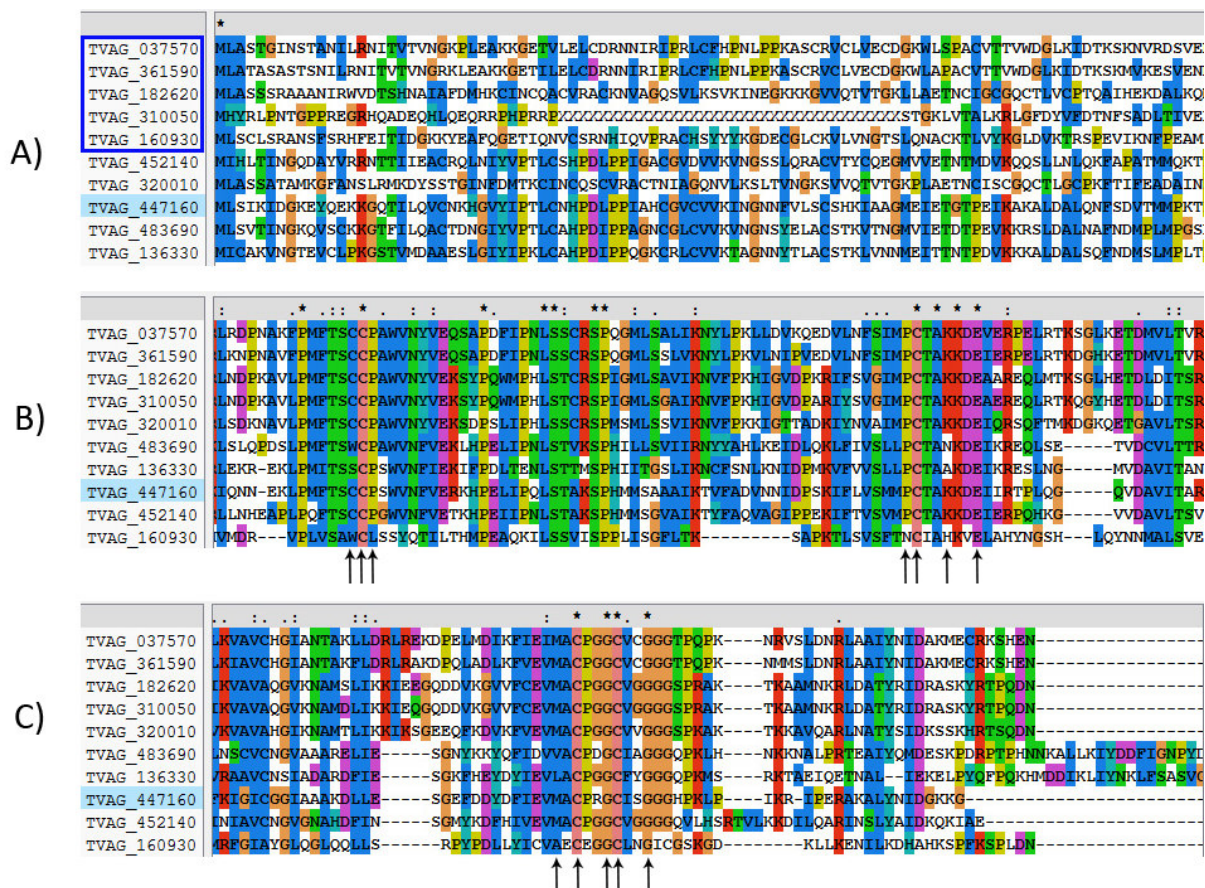
Graf 4: Porovnání aktivit cytosolických hydrogenáz wild-type *T. vaginalis* při různém pH. Hodnoty jsou průměr ze 3 měření $\pm$ SD.

6.2. Stanovení vhodného genu pro cytosolickou hydrogenázu *T. vaginalis*

Ve chvíli, kdy jsme se dostatečně přesvědčili o tom, že v cytosolu *T. vaginalis* by se mohla fyziologicky nacházet další hydrogenáza, jsme se pokusili mezi homology hydrogenáz bez predikované hydrogenosomální signální sekvence anotovanými v genomu *T. vaginalis* určit vhodný gen pro cytosolickou hydrogenázu. Vybraný gen jsem následně zaklonovala do plasmidu TagVag s HA-tagem a transfekovala jím buňky *T. vaginalis*.

6.2.1. Porovnání proteinových sekvencí hydrogenázových homologů *T. vaginalis*

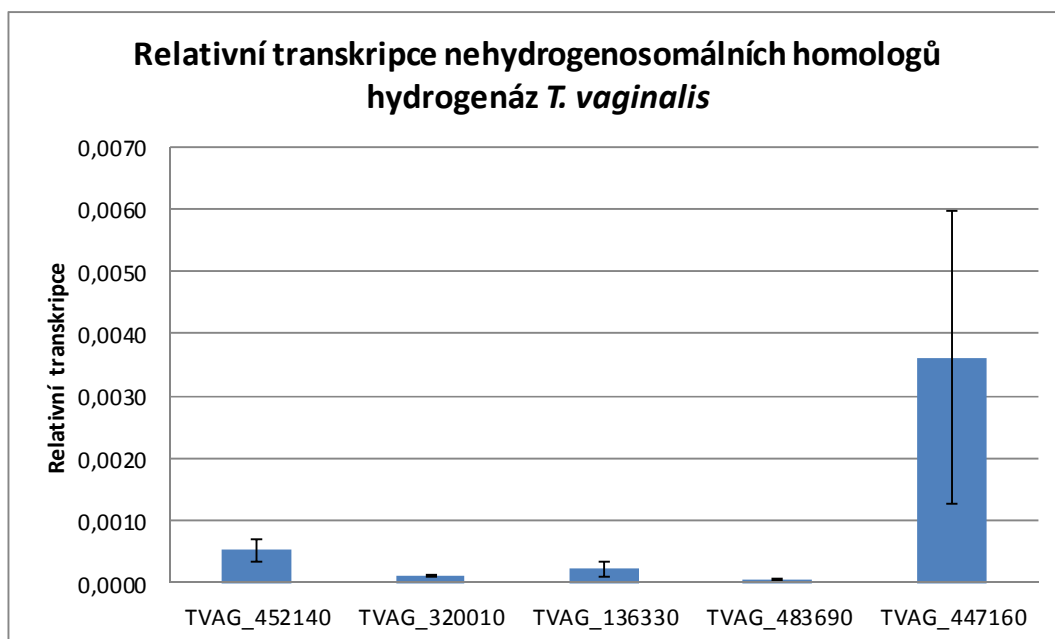
V genomové databázi <http://trichdb.org/trichdb/> jsem si našla proteinové sekvence všech deseti homologů hydrogenáz a v programu ClustalX jsem si vytvořila alignment. Poté jsem porovnála N-terminální sekvence a konzervativní zbytky H-klastru jednotlivých proteinů, abych našla vhodný homolog pro expresi v *T. vaginalis*. Jako vhodný gen jsme vybrali protein TVAG_447160 (C-Hyd), který postrádá typickou hydrogenosomální signální sekvenci a zároveň má zachované všechny konzervativní aminokyseliny H-klastru, jenž je nezbytný pro enzymatickou aktivitu hydrogenáz. Na obr. 9 je porovnání vybraných částí alignmentu hydrogenázových homologů.



Obr. 9: Alignment deseti hydrogenázových homologů *T. vaginalis*. (A) Porovnání N-terminálních sekvencí; modrý rámeček označuje proteiny nalezené v proteomu hydrogenosomu (Schneider et al., 2011; Rada et al., 2011). (B, C) Porovnání konzervativních úseků H-klastru; aminokyselinové zbytky v konzervativních pozicích jsou označeny šipkami. Námí vybraný protein pro další analýzu TVAG_447160 je zvýrazněn světle modře.

6.2.2. Relativní exprese nehydrogenosomálních homologů hydrogenáz *T. vaginalis*

Po výběru vhodného genu na základě sekvence jsme chtěli zjistit, jestli je tento protein za normálních okolností ve wild-type *T. vaginalis* transkribován. Pro porovnání exprese homologů hydrogenáz jsem použila metodu qRT-PCR (quantitative real-time PCR). K výpočtu relativní transkripce jsem použila metodu $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Celkovou RNA jsem izolovala TRIZOLEm a následně přepsala do cDNA pomocí SuperScript™ Reverse Transcriptase. Čistotu RNA a přepsanou cDNA jsem kontrolovala pomocí PCR. Pro analýzu cDNA pomocí qRT-PCR byly použity primery uvedené v kapitole 5.5.24. V grafu 5 je porovnávána relativní transkripce vybraných genů, podle které je zřejmé, že námí vybraný protein se v *T. vaginalis* transkribuje.

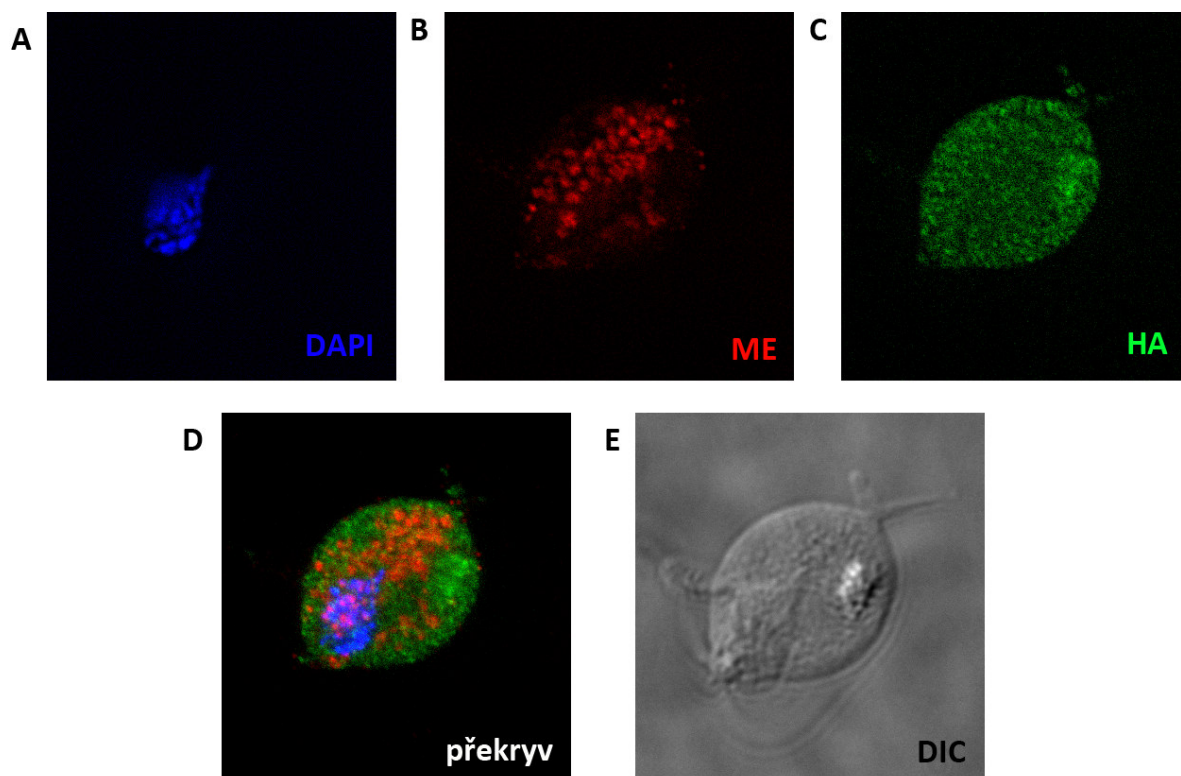


Graf 5: Porovnání relativní transkripce nehydrogenosomálních homologů hydrogenáz ve wild-type *T. vaginalis*.

6.3. Lokalizace C-Hyd v buňkách *T. vaginalis*

6.3.1. Lokalizace C-Hyd pomocí nepřímé imunofluorescence

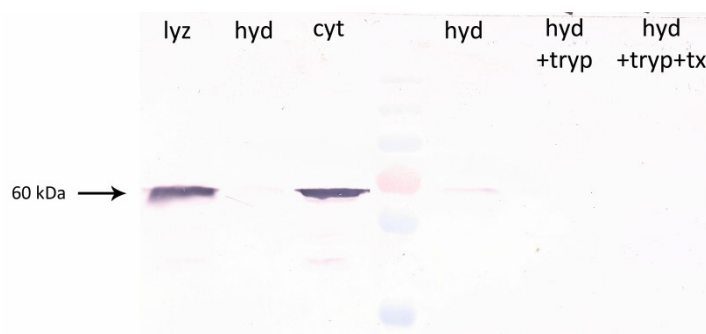
Pro lokalizaci C-Hyd jsem musela nejdříve transformovat buňky *T. vaginalis* plasmidem TagVag nesoucím hemagglutininový (HA) tag, do kterého jsem vložila gen pro C-Hyd (C-Hyd-HA). Buňky jsem transformovala podle postupu v kapitole 5.5.13. Z transformovaných buněk jsem připravila preparáty pro imunofluorescenci dle návodu v kapitole 5.5.14. Jako primární protilátky jsem použila myší anti-HA monoklonální protilátku (1:1000) a králičí polyklonální protilátku proti hydrogenosomálnímu jablečnému (ME) enzymu (1:1000). Jako sekundární protilátky jsem použila protilátku proti myšimu IgG značená ALEXA FLUOR 488 (zelená, 1:1000) a protilátku proti králičímu IgG značená ALEXA FLUOR 594 (červená, 1:1000). Jadernou DNA jsem značila DAPI. Na obr. 10 je vidět, že spolu anti-HA značená hydrogenáza a anti-ME značené hydrogenosomy nekolokalizují, což naznačuje cytosolickou lokalizaci C-Hyd.



Obr. 10: Lokalizace C-Hyd-HA v buňce *T. vaginalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. (A) Jádru označené DAPI. (B) Hydrogenosomy označené protilátkou proti ME. (C) Anti-HA značená hydrogenáza. (D) Složený obrázek *T. vaginalis*. (E) Nomarského kontrast.

6.3.2. Lokalizace pomocí Western blotové analýzy

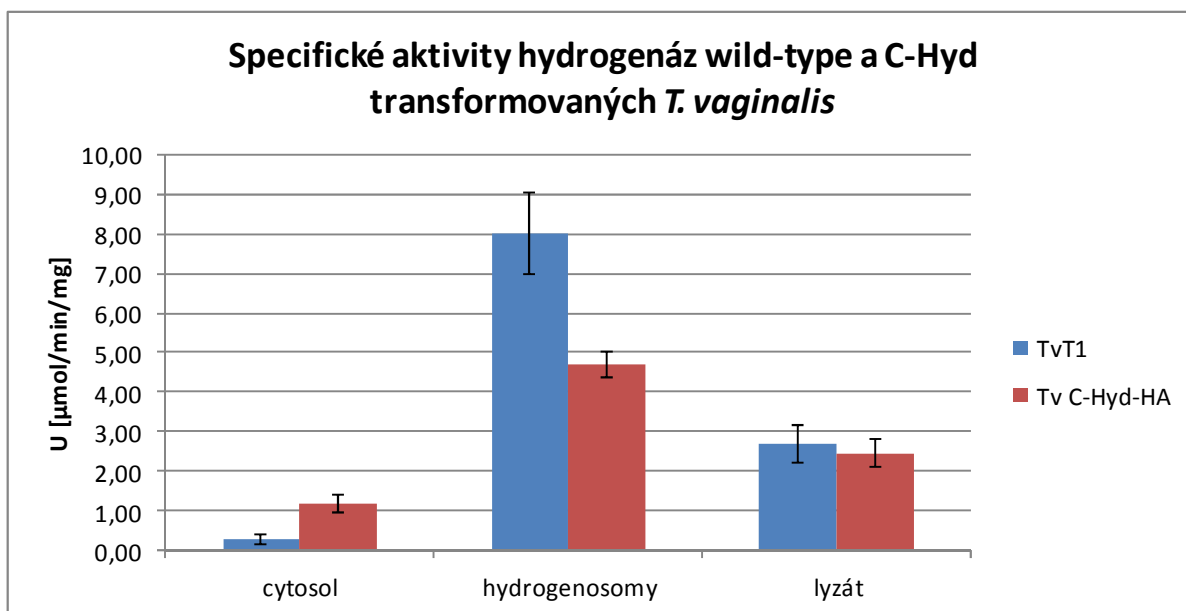
Pro Western blotovou analýzu lokalizace studované hydrogenázy jsem si připravila buněčné frakce (lyzát, hydrogenosomy a cytosol) z buněk *T. vaginalis* exprimujících C-Hyd s HA-tagem (Tv C-Hyd-HA). Jako primární protilátku jsem použila myší anti-HAHA monoklonální protilátku (1:1000) a jako sekundární protilátku jsem použila protilátku proti myšimu IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000). Na obr. 11 je jasně vidět lokalizace HA-tagované hydrogenázy v cytosolu, nicméně nepatrný band se objevil i v hydrogenosomální frakci, proto jsem provedla trypsinizaci hydrogenosomů podle protokolu v kapitole 5.5.18. Po trypsinizaci hydrogenosomální band zmizel, což naznačuje, že protein je pouze asociovaný s vnější membránou hydrogenosomu a není přítomný v matrix organely.



Obr. 11: Lokalizace C-Hyd-HA v buněčných frakcích *T. vaginalis* pomocí anti-HA protilátky Western blotovou analýzou. Lyz, buněčný lyzát; hyd, hydrogenosomy; cyt, cytosol; hyd+tryp, hydrogenosomy ošetřené trypsinem; hyd+tryp+tx, hydrogenosomy ošetřené trypsinem a Tritonem.

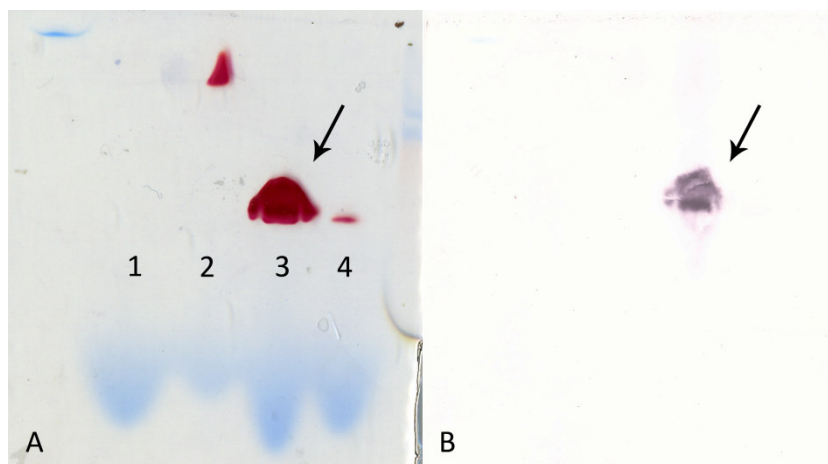
6.4. Aktivita hydrogenáz v buňkách *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd-HA

Kromě Western blotové analýzy jsem vyizolované buněčné frakce s C-Hyd-HA použila k měření hydrogenázových aktivit. Chtěli jsme zjistit, jestli přítomnost C-Hyd-HA v nadbytku v buňce nějakým způsobem ovlivnila aktivitu hydrogenáz v jednotlivých buněčných frakcích. V grafu 6 je zaznamenána aktivita hydrogenáz v buněčných frakcích TvT1 v porovnání s aktivitou v buňkách Tv C-Hyd-HA. Jak je vidět, cytosolická hydrogenázová specifická aktivita je oproti TvT1 vyšší, kdežto hydrogenosomální je nižší.



Graf 6: Porovnání specifických aktivit hydrogenáz wild-type *T. vaginalis* (TvT1) a *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd s HA-tagem (Tv C-Hyd-HA) v jednotlivých buněčných frakcích. Hodnoty jsou průměr ze 3 měření $\pm$ SD.

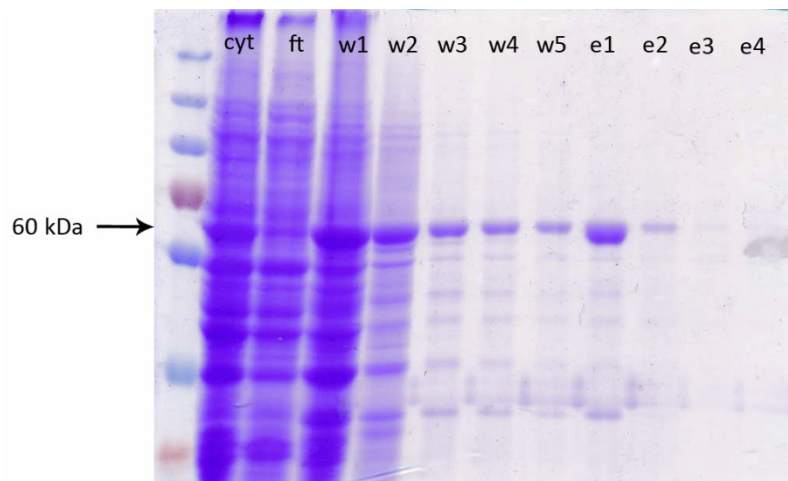
Vedle spektrofotometrického měření jsem provedla také vizualizaci cytosolických hydrogenázových aktivit na nativním gelu. Na obr. 12A je nativní gel, na kterém je zřetelný rozdíl mezi aktivitou v různých buněčných frakcích, na obr. 12B je tentýž gel přebílený na nitrocelulózovou membránu, na které je vidět, že většina pozorované aktivity náleží označenému proteinu C-Hyd-HA.



Obr. 12: Kolokalizace C-Hyd-HA na nativním gelu a Western blotu. (A) Nativní gel. 1, hydrogenosomy Tv C-Hyd-HA; 2, hydrogenosomy TvT1; 3, cytosol Tv C-Hyd-HA; 4, cytosol TvT1. (B) Western blot vizualizovaný primární myší anti-HA protilátkou a vyvolaný alkalickou fosfatázou. Šipky označují kolokalizující protein C-Hyd-HA.

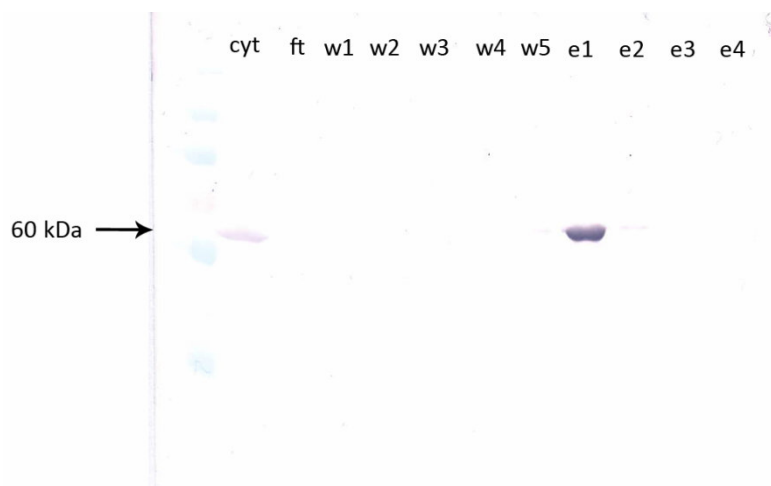
6.5. Izolace proteinu C-Hyd na Ni-NTA koloně

Pro budoucí funkční studie jsme se rozhodli pokusit izolovat aktivní rekombinantní cytosolickou hydrogenázu z cytoplasmy *T. vaginalis*. Abych mohla protein C-Hyd izolovat na koloně pomocí afinitní chromatografie, musela jsem ho opatřit His-tagem (C-Hyd-His). K amplifikaci genu jsem použila speciální reverse primer opatřený His repeticí a stop kodonem. Výsledný produkt jsem zaklonovala do plasmidu TagVag, kterým jsem transformovala buňky *T. vaginalis*. Pro izolaci jsem si napěstovala 250 ml buněk exprimujících C-Hyd s His-tagem (Tv C-Hyd-His), ze kterých jsem získala cytosolickou frakci, již jsem ihned zpracovala podle protokolu v kapitole 5.5.19. Výsledek izolace je znázorněn na obr. 13. Protein se úspěšně navázal na kolonu a téměř čistý se uvolnil při prvním elučním kroku pomocí 250mM imidazolu.



Obr. 13: SDS-PAGE (10% gel) izolace C-Hyd-His na Ni-NTA koloně. Cyt, cytosol buněk Tv C-Hyd-His; ft, flowthrough (proteiny neinteragující s matricí kolony); w1-w5, proteiny uvolněné promývacím pufrem; e1-e4, proteiny specificky uvolněné elučním pufrem.

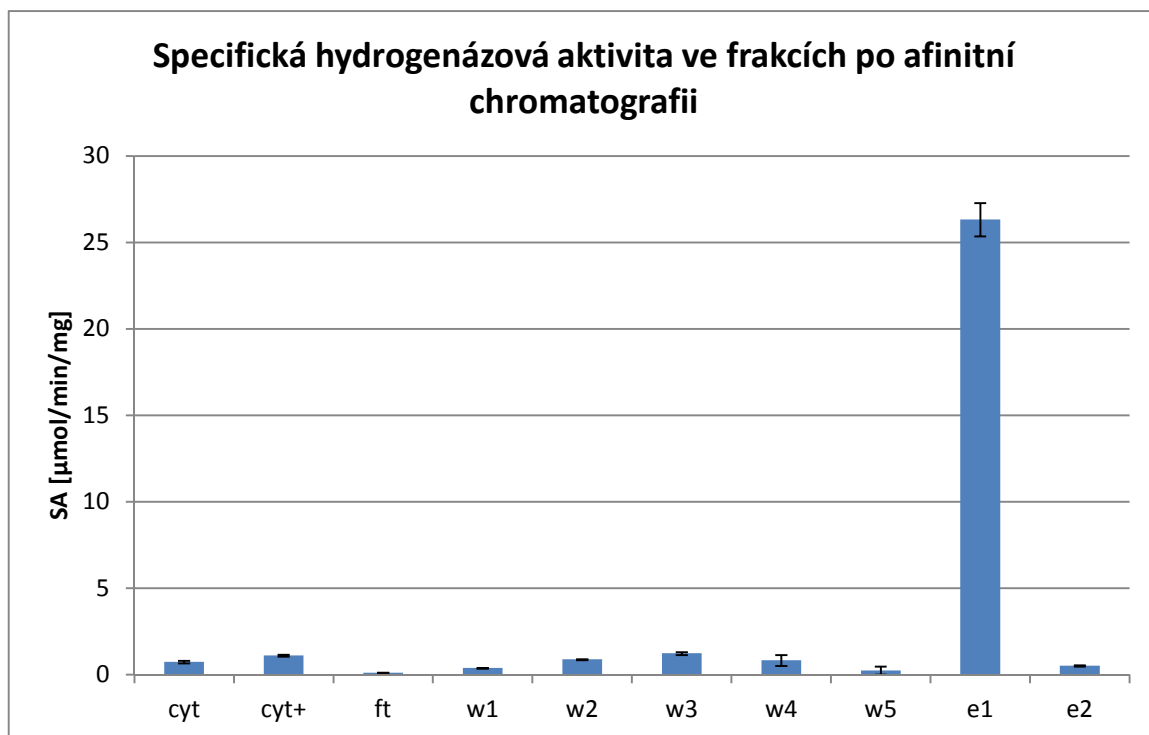
Kromě CBB barveného gelu jsem udělala s týmiž vzorky ještě jeden gel, který jsem analyzovala pomocí Western blotu. Jako primární protilátku jsem použila myší anti-5xHis monoklonální protilátku (1:1000) a jako sekundární protilátku jsem použila protilátku proti myšimu IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000). Na obr. 14 je vidět band, který kolokalizuje s elucí 1 na obr. 13, což dokazuje, že na kolonu se opravdu navázal v buňkách overexprimovaný protein C-Hyd-His.



Obr. 14: Western blotová analýza izolace C-Hyd-His na Ni-NTA koloně. C-Hyd-His byla vizualizována primární myší anti-HAis protilátkou a vyvolána alkalickou fosfatázou. Cyt, cytosol buněkTv C-Hyd-His; ft, flowthrough (proteiny neinteragující s matricí kolony); w1-w5, proteiny uvolněné promývacím pufrem; e1-e4, proteiny specificky uvolněné elučním pufrem.

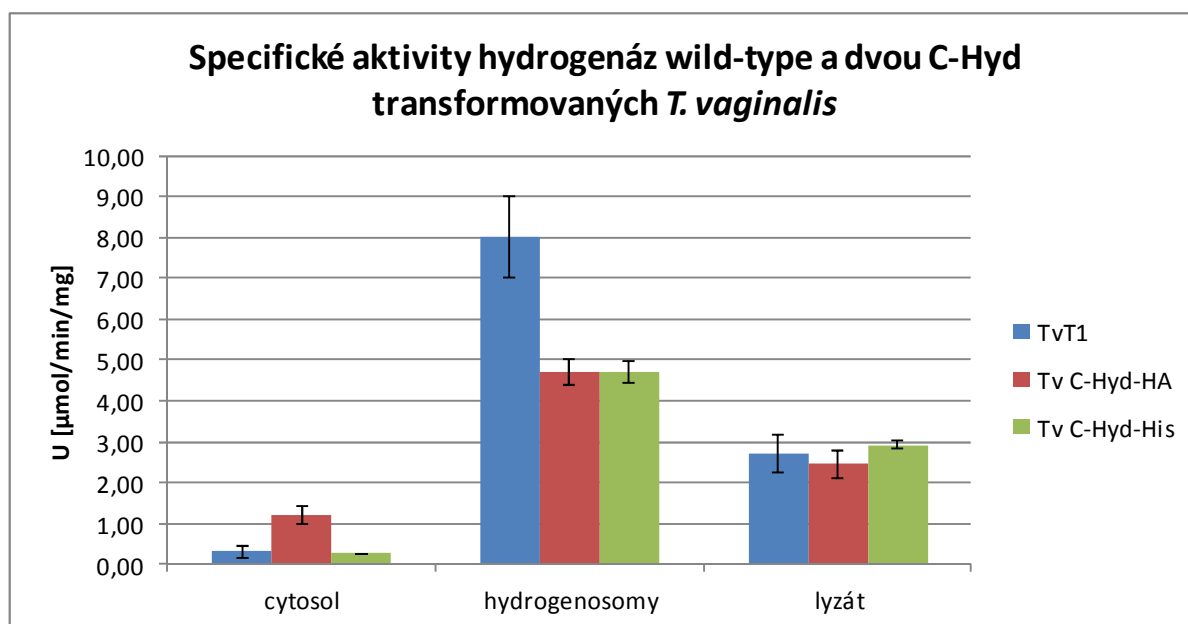
6.5.1. Aktivita izolovaného proteinu C-Hyd-His

V izolovaných frakcích po afinitní chromatografii jsem změřila hydrogenázovou aktivitu, abych potvrdila, že se jedná o hydrogenázu. Z grafu 7 je jasné, že naše premisa byla správná. Porovnání proteinového složení frakce e1 z obr. 13 s aktivitami v grafu 7 dokazuje úspěšnost izolace aktivního rekombinantního proteinu C-Hyd-His, který má v relativně čisté podobě specifickou aktivitu 26,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.



Graf 7: Porovnání specifických aktivit hydrogenáz mezi frakcemi izolovanými na Ni-NTA koloně. Cyt, cytosol buněk Tv C-Hyd-His; cyt+, cytosol buněk Tv C-Hyd-His s přidaným NaCl, FeSO_4 a DTT; ft, flowthrough (proteiny neinteragující s matricí kolony); w1-w5, proteiny uvolněné promývacím puforem; e1-e2, proteiny specificky uvolněné elučním puforem.

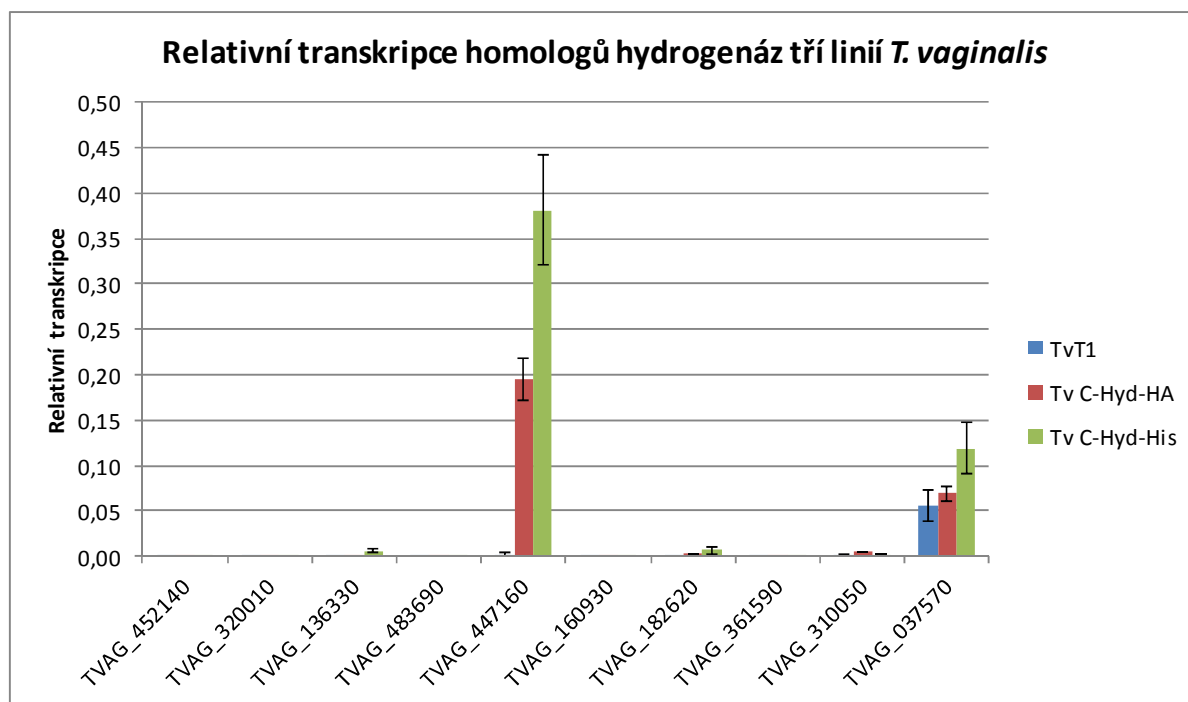
Hydrogenázovou aktivitu jsem změřila také v jednotlivých buněčných frakcích získaných diferenciální centrifugací a porovnala jsem je s aktivitami v cytosolu, hydrogenosomech a lyzátu TvT1 a Tv C-Hyd-HA. Ačkoli jsme očekávali podobný fenotyp, jako měla Tv C-Hyd-HA, na grafu 8 je vidět, že aktivita v obou buněčných kompartmentech je nízká.



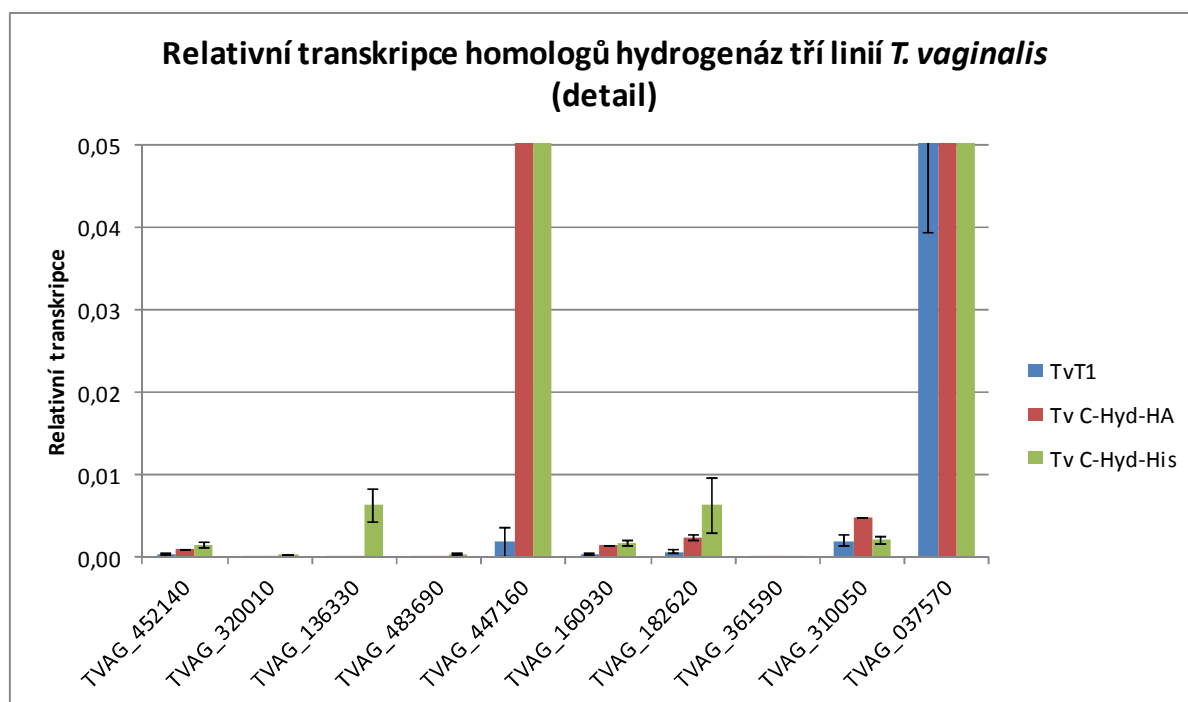
Graf 8: Porovnání specifických aktivit hydrogenáz wild-type *T. vaginalis* (TvT1), *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd s HA-tagem (Tv C-Hyd-HA) a *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd s His-tagem (Tv C-Hyd-His) v jednotlivých buněčných frakcích. Hodnoty jsou průměr ze 3 měření $\pm$ SD.

6.6. Exprese hydrogenázových homologů různých linií *T. vaginalis*

Pro porovnání exprese homologů hydrogenáz mezi třemi různými liniemi *T. vaginalis* (TvT1, Tv C-Hyd-HA, Tv C-Hyd-His) jsem použila metodu qRT-PCR (quantitative real-time PCR). K výpočtu relativní transkripce jsem použila metodu $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Na grafu 9 a 10 jsou výsledky provedené qRT-PCR.



Graf 9: Porovnání relativní transkripce hydrogenázových homologů u tří linií *T. vaginalis* – TvT1, Tv C-Hyd-HA, Tv C-Hyd-His.



Graf 10: Porovnání relativní transkripce hydrogenázových homologů u tří linií *T. vaginalis* – TvT1, Tv C-Hyd-HA, Tv C-Hyd-His. Detail grafu 9.

7. DISKUSE

Má práce byla zaměřena na studium hydrogenáz mikroaerofilního parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*. V genomu *T. vaginalis* bylo identifikováno deset paralogů hydrogenáz (Carlton et al., 2007), z nichž pět bylo nalezeno v proteomu hydrogenosomu trichomonády (Schneider et al., 2011; Rada et al., 2011; Beltrán et al., 2013). Hydrogenosomální hydrogenázy *T. vaginalis* se účastní energetického metabolismu hydrogenosomu a jejich funkcí je katalýza redukce dvou protonů dvěma elektrony za vzniku molekulárního vodíku, který je konečným metabolickým produktem. Lokalizace a funkce zbývajících pěti paralogů zůstávala dosud neznámá. Už Lindmark a Müller při prvotních studiích hydrogenosomů, při kterých dělali frakcionace a lokalizace marker enzymů, naměřili nízkou hydrogenázovou aktivitu také v cytosolu (Lindmark & Müller, 1973). Nikde v článku však tuto skutečnost nekomentovali, zřejmě naměřenou aktivitu považovali za kontaminaci pocházející z hydrogenosomů. My jsme se rozhodli dokázat, že naměřená cytosolická hydrogenázová aktivita není pouze únikem hydrogenáz z hydrogenosomů, k němuž došlo během frakcionace lyzátu, ale jedná se o aktivitu skutečné cytosolické hydrogenázy.

Hydrogenázy jsou enzymy, které katalyzují vzájemnou přeměnu protonů a elektronů na vodík podle reakce: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$. Ačkoli byla naprostá většina hydrogenáz popsána u prokaryotních organismů, najdeme je též u některých jednobuněčných eukaryot (Vignais & Billoud, 2007). Hydrogenázy *T. vaginalis*, stejně jako hydrogenázy ostatních eukaryot, byly charakterizované jako [FeFe] hydrogenázy (Payne et al., 1993). Eukaryotické hydrogenázy byly dříve považovány za jedinečné enzymy definující hydrogenosom, nicméně v nedávné době byly postupně objeveny i v cytosolu některých eukaryotických organismů, např. *G. intestinalis*, *E. histolytica* (Nixon et al., 2004), *S. salmonicida* (Jerlström-Hultqvist et al., 2013), *M. balamuthi* (Nývltová et al., 2013) či *N. gruberi* (Tsaousis et al., 2014). Není tedy důvod předpokládat čistě hydrogenosomální lokalizaci hydrogenáz u *T. vaginalis*, zvláště pokud se v genomu nacházejí homology hydrogenáz bez známé lokalizace, funkce a rozpoznatelného hydrogenosomálního importního signálu.

Nejjednodušším způsobem, jak dokázat přítomnost hydrogenázy v cytosolu, by samozřejmě byla izolace tohoto proteinu klasickými biochemickými separačními metodami. V tomto případě to bohužel nebylo možné, neboť aktivita labilní hydrogenázy vymizí po třetím chromatografickém kroku, po kterém je vzorek stále tak komplexní, že v něm

nebylo možné pomocí hmotnostní spektrometrie předpokládanou cytosolickou hydrogenázu najít (data nezahrnuta).

Mým prvním úkolem bylo prokázat aktivitu hydrogenáz v cytosolu wild-type *T. vaginalis* a dokázat, že se nejedná pouze o kontaminaci z hydrogenosomů. Aktivitu hydrogenáz jsem měřila standardně v 25mM glycinovém pufru o pH 8,5. Zpočátku jsem experimentovala s různými pufrů a různými koncentracemi solí (data nezahrnuta), z nichž se nejlépe při měření osvědčil právě výše zmíněný glycinový pufr. Abych měla co největší jistotu, že detekovaná cytosolická hydrogenázová aktivita pochází opravdu z cytosolu, provedla jsem desítky měření v nezávisle izolovaných buněčných frakcích a před každým měřením jsem stanovila latenci hydrogenosomů. Všechna měření ukázala sice nízkou, ale stabilní aktivitu hydrogenáz v cytosolické frakci. Pomocí nativní elektroforézy jsem se pak pokusila zjistit, jestli se hydrogenázové aktivity v obou frakcích budou lišit elektroforetickou mobilitou, tedy půjde s největší pravděpodobností o rozdílné izoenzymy. Vizualizovaná aktivita hydrogenáz obou frakcí se na gelu opravdu nacházela v rozdílné vzdálenosti od startu, nicméně část hydrogenosomální aktivity dokonce zůstala v zaostřovacím gelu, je tedy možné, že hydrogenosomální hydrogenáza má za použitého pH velmi slabý záporný náboj. Proto jsme se rozhodli pro pokusy s narušením latence hydrogenosomů s cílem zjistit, zda nešetná preparace hydrogenosomů nemůže vést ke změně náboje hydrogenosomální hydrogenázy, což by se projevilo změnou elektroforetické mobility proteinu. Pokud by takto modifikovaná hydrogenáza měla stejnou elektroforetickou mobilitu jako předpokládaný cytosolický izoenzym, velmi pravděpodobně by to indikovalo, že cytosolická hydrogenázová aktivita je artefakt způsobený přípravou buněčných frakcí. Při spektrofotometrickém měření aktivit ve frakcích získaných ze zmražovaného homogenátu se podle očekávání téměř veškerá hydrogenázová aktivita dostala z hydrogenosomů do cytosolické frakce. Poměr aktivit hydrogenáz mezi cytosolem a hydrogenosomy se tedy obrátil. Pomocí nativní elektroforézy jsme pak chtěli zjistit, jak se změní aktivita hydrogenáz na gelu v cytosolické frakci získané ze standardně připraveného lyzátu a zmražovaného lyzátu. Po vizualizaci aktivit se v cytosolické frakci získané z homogenátu s hydrogenosomy s porušenou latencí nad obvyklým cytosolickým bandem objevil další band, který naznačuje přítomnost dalších hydrogenáz, které se v cytosolu běžně nevyskytují. Považujeme je za důkaz, že hydrogenázovou aktivitu v cytosolou a v hydrogenosomech mají na svědomí rozdílné izoenzymy, tudíž aktivita hydrogenáz v cytosolu není jen kontaminací z hydrogenosomů.

Dále jsme se snažili zjistit, zdali se hydrogenosomální a cytosolické hydrogenázy neliší v pH optimu, což by byl další důkaz pro podporu hypotézy o rozdílnosti těchto proteinů.

Optimální pH pro aktivitu hydrogenáz jsem hledala mezi 7,0 a 10,5. Při porovnání grafů s aktivitami hydrogenáz v hydrogenosomální a cytosolické frakci lze vidět, že v obou frakcích je aktivita nejvyšší při pH 9 a pH optimum se mezi sebou hydrogenázy neliší, nicméně cytosolické hydrogenázy jsou relativně více aktivní v pufrch s alkalickým pH. Také je třeba zmínit, že při téměř každém měření pH optim aktivita hydrogenáz značně kolísala a výsledky byly velmi těžko reprodukovatelné.

Když jsme potvrdili, že cytosolická hydrogenázová aktivita není jen kontaminací z hydrogenosomů, bylo nezbytné najít protein, který by za tuto aktivitu mohl být zodpovědný. Při porovnávání proteinových sekvencí hydrogenázových homologů v genomu *T. vaginalis* jsem si všímala hlavně N-terminální sekvence a sekvence H-klastru. Typická N-terminální signální sekvence pro import proteinu do matrix hydrogenosomu je popsána v kapitole 3.3. Hledala jsem protein, který bude postrádat takovou sekvenci a bude tedy s velkou pravděpodobností lokalizován v cytosolu. Důležité bylo také vybrat protein, který bude obsahovat konzervované úseky H-klastru se všemi klíčovými cysteinovými a dalšími aminokyselinovými zbytky zobrazenými na obr. 4, které jsou nezbytné pro správnou funkci [FeFe]-hydrogenáz. Pro další pokusy jsme nakonec vybrali gen TVAG_447160, který splňoval naše kritéria a dostal pracovní název C-Hyd (Cytosolická-**H**ydrogenáza). Než jsem začala s klonováním, chtěla jsem se přesvědčit, jestli je tento gen za normálních okolností ve wild-type *T. vaginalis* vůbec transkribován. Pomocí metody qRT-PCR jsem porovnála relativní transkripci genů kódujících proteiny, jež nebyly nalezeny v proteomu hydrogenosomu (Schneider et al., 2011; Rada et al., 2011; Beltrán et al., 2013). Výsledky qRT-PCR ukázaly, že námi vybraný gen se v trichomonádě exprimuje, a to dokonce nejvíce ze všech testovaných genů.

Proteinem C-Hyd zaklonovaném ve vektoru TagVag s HA-tagem jsem transfekovala buňky *T. vaginalis* a vzniklou linii jsem pojmenovala Tv C-Hyd-HA. V těchto buňkách jsem následně protein C-Hyd-HA lokalizovala. Na základě imunofluorescence i Western blotové analýzy jsem prokázala, že C-Hyd-HA je lokalizován v cytosolu *T. vaginalis*. Při Western blotové analýze se mi však objevil nepatrný band i v hydrogenosomální frakci, byť to na první pohled nemusí být v této tištěné verzi vidět. Pro jistotu jsem tedy provedla trypsinizaci hydrogenosomů, abych se přesvědčila, že protein je pouze asociovaný s vnějším membránou hydrogenosomu. Po inkubaci hydrogenosomů s trypsinem band opravdu zmizel, což je důkaz, že protein C-Hyd-HA se nenacházel v matrix hydrogenosomů, nýbrž pouze na povrchu.

Ačkoli podle zkušeností naší laboratoře není obvyklé, aby buňky *T. vaginalis* s overexprimovaným proteinem vykazovaly nějaký výrazný fenotyp, chtěli jsme zjistit, zdali se zvýšená exprese hydrogenázy v cytosolu projeví při měření hydrogenázových aktivit v jednotlivých buněčných frakcích. Spektrofotometrická měření ukázala vyšší cytosolickou hydrogenázovou aktivitu, což jen potvrdilo naši hypotézu, že se jedná o pravou cytosolickou hydrogenázu. Kromě zvýšené aktivity hydrogenáz v cytosolické frakci jsem zaznamenala také sníženou aktivitu hydrogenáz v hydrogenosomech. Zatím nemáme jednoznačné vysvětlení pro tento jev, není však vyloučené, že by zvýšená exprese hydrogenázy v cytosolu mohla ovlivnit energetický metabolismus trichomonády. Tuto skutečnost ještě zbývá prozkoumat. Také nelze vyloučit, že jde o důsledek silné selekce po transformaci trichomonád, které nejsou homogenní klonální linií.

Kromě spektrofotometrického měření jsem provedla porovnání aktivit také pomocí nativní elektroforézy. Podle očekávání se po vizualizaci aktivit enzymů na gelu objevil v cytosolické frakci Tv C-Hyd-HA výrazný červený band, který potvrdil výsledky spektrofotometrických měření. Abychom se ujistili, že za pozorovanou aktivitu je zodpovědný skutečně rekombinantní protein C-Hyd-HA, přeblotovala jsem vyvolaný nativní gel na nitrocelulózovou membránu. Na membráně se po inkubaci s anti-HA protilátkou a po vyvolání alkalickou fosfatázou objevil band stejného tvaru a velikosti jako na původním gelu, což dokazuje, že protein C-Hyd-HA je zodpovědný za většinu hydrogenázové aktivity na nativním gelu.

Vzhledem k tomu, že bychom v budoucnu chtěli provést s proteinem C-Hyd funkční studie, rozhodli jsme se izolovat čistou aktivní rekombinantní cytosolickou hydrogenázu z cytoplasmy *T. vaginalis*. Protein C-Hyd jsem opatřila His-tagem a zaklonovala ho do plasmidu TagVag. Buňky *T. vaginalis* transfekované tímto plasmidem jsem pojmenovala Tv C-Hyd-His. Ačkoli bylo nepravděpodobné, že by se lokalizace C-Hyd v souvislosti s použitím odlišného Tagu změnila, provedla jsem pro jistotu Western blotovou analýzu buněčných frakcí, díky níž jsem potvrdila cytosolickou lokalizaci C-Hyd-His stejně jako u Tv C-Hyd-HA (data nezahrnuta). Zizolovanou cytosolickou frakci jsem pak nanesla na Ni-NTA kolonu. Na gelu barveném CBB je vidět, že protein C-Hyd-His se na kolonu úspěšně navázal a poté téměř čistý uvolnil hned při prvním elučním kroku 250mM imidazolem. Pro potvrzení, že se jedná opravdu o C-Hyd s His-tagem, jsem provedla Western blotovou analýzu druhého totožného gelu, která prokázala, že jde opravdu o protein C-Hyd. Abych se přesvědčila, že takto zizolovaný protein zůstává aktivní, změřila jsem ve všech frakcích získaných afinitní chromatografií hydrogenázovou aktivitu. V první eluční frakci jsem

naměřila mnohonásobně vyšší hydrogenázovou aktivitu než v samotném cytosolu, čímž jsem znovu potvrdila úspěšnost izolace. Purifikovaný protein C-Hyd-His vykazoval specifickou aktivitu 26,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, což je obecně řádově méně, než je obvyklé u hydrogenáz izolovaných z anaerobních bakterií. Pro porovnání uvádím např. Cpl hydrogenázu z bakterie *Clostridium pasteurianum*, která v závislosti na testovacích podmínkách po purifikaci vykazuje specifickou aktivitu až 1200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Kuchenreuther et al., 2010). Mezi důležité faktory při stanovení specifické aktivity daného proteinu patří např. způsob izolace proteinu či použitý elektronový přenašeč (MV, feredoxin, metylen blue apod.). V tuto chvíli si tedy nemůžeme být jisti, zda je relativně nízká specifická aktivita C-Hyd-His fyziologická a charakteristická pro daný protein, či je snížena například vlivem C-terminálního tagu nebo částečnou inaktivací během purifikace. I když se může zdát, že je izolace proteinu pomocí afinitní chromatografie dost přímočará, nemohli jsme si být výsledkem do poslední chvíle jisti. Hydrogenázy jsou enzymy velmi citlivé ke kyslíku, a protože v našich podmínkách není technicky možné provést izolaci anaerobně, hrozilo značné riziko, že aktivitu hydrogenázy nebude možné kvůli inhibici kyslíkem po izolaci naměřit. To se naštěstí nestalo, a tak se nám podařilo připravit si půdu pro budoucí funkční studie s tímto proteinem.

Jen pro úplnost jsem naměřila hydrogenázovou aktivitu v jednotlivých buněčných frakcích získaných z buněk Tv C-Hyd-His. Očekávali jsme podobný fenotyp jako při měření aktivit hydrogenáz ve frakcích z Tv C-Hyd-HA, ale naše očekávání se nevyplnilo. Aktivity v obou frakcích, cytosolu i hydrogenosomech, byly nižší než ve wild-type *T. vaginalis*. Je možné, že buňky *T. vaginalis* zatěžuje overexprese proteinu s His-tagem, protože oproti wild-type a Tv C-Hyd-HA buňkám vykazovaly delší generační dobu, a to se mohlo odrazit na měřených enzymatických aktivitách. Tuto možnost by však bylo nutné potvrdit změřením aktivit dalších enzymů.

Na základě pozorování změny hydrogenázových aktivit v buněčných frakcích wild-type *T. vaginalis* a Tv C-Hyd-HA jsme se rozhodli pro zopakování qRT-PCR, pomocí které jsme chtěli zjistit, jestli se posun v aktivitách hydrogenáz Tv C-Hyd-HA nějak projevil na expresi ostatních hydrogenázových homologů. Podle očekávání byla mnohonásobně zvýšena relativní transkripce (RT) proteinu C-Hyd v obou transfekovaných liniích *T. vaginalis*. U linie Tv C-Hyd-His byla RT dokonce vyšší než u Tv C-Hyd-HA, přestože výsledky měření hydrogenáz tomu neodpovídají. Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že v době izolace RNA z jednotlivých linií byla již linie Tv C-Hyd-HA pasážována tolikrát, že mohla postupně začít ztrácet expresi C-Hyd. Zarážející je spíše fakt, že v liniích

s overexprimovaným C-Hyd byla zaznamenána i vyšší RT hydrogenosomálních hydrogenáz oproti wild-type *T. vaginalis*, což vůbec neodráží výsledky spektrofotometrických měření. Tento jev zatím nedokážeme vysvětlit a je třeba vzít v potaz, že se zatím jedná pouze o předběžné výsledky, ze kterých nelze dělat ukvapené závěry.

Prokázání přítomnosti hydrogenázy v cytosolu *T. vaginalis* zásadně mění naše chápání metabolismu trichomonády. Hydrogenosomální hydrogenáza přijímá elektrony od feredoxinu, který je přebírá z pyruvátu v reakci PFO. Podle všech dosavadních poznatků však v cytoslu není přítomna ani PFO, ani feredoxiny (všechny paralogy obou proteinů mají hydrogenosomální signální sekvence a byly identifikovány v proteomech hydrogenosomů). Otázkou tedy zůstává, co by mohlo sloužit jako donor elektronů pro cytosolickou hydrogenázu a jaký je její fyziologický redoxní partner. Také není vyloučeno, že by cytosolická hydrogenáza mohla katalyzovat reakci opačným směrem a fungovala by jako oxidáza vodíku uvolňovaného z hydrogenosomu, čímž by se podílela na transportu redukčních ekvivalentů z hydrogenosomů do cytoplasmy a pomáhala by udržovat cytosolickou redoxní rovnováhu. Rovněž není jasné, jakým způsobem by mohlo docházet k tvorbě a maturaci H-klastru cytosolické hydrogenázy. Specializovaný enzymatický systém zodpovědný za syntézu H-klastru se totiž nachází pouze v hydrogenosomu (Pütz et al., 2006; Nicolet et al., 2010). Tyto otázky budou předmětem dalšího zkoumání.

8. ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem hydrogenáz mikroaerofilního prvoka *T. vaginalis*. U *T. vaginalis* byla přítomnost těchto enzymů prokázána zatím jen v hydrogenosomech, ačkoli mezi eukaryoty najdeme zástupce s hydrogenázami lokalizovanými také v cytosolu. Mým úkolem bylo prokázat také u *T. vaginalis* přítomnost cytosolických hydrogenáz.

- Pomocí spektrofotometrických měření a nativních elektroforéz jsem prokázala v cytosolu *T. vaginalis* přítomnost hydrogenázové aktivity, která nebyla jen kontaminací z hydrogenosomů.
- Na základě porovnání proteinových sekvencí a relativní transkripce jsem zvolila vhodný protein, který by mohl představovat cytolickou hydrogenázu (C-Hyd).
- Protein C-Hyd opatřený HA-tagem jsem pomocí imunofluorescence a Western blotové analýzy lokalizovala do cytosolu.
- V buňkách *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd jsem měřením hydrogenázových aktivit prokázala pozměněný fenotyp, který se projevoval vyšší aktivitou hydrogenáz v cytosolu a nižších v hydrogenosomech v porovnání s wild-type *T. vaginalis*.
- Úspěšně jsem pomocí afinitní chromatografie z cytosolu izolovala aktivní protein C-Hyd opatřený His-tagem.
- Provedla jsem prvotní pokus o porovnání exprese homologů hydrogenáz mezi wild-type *T. vaginalis* a *T. vaginalis* s overexprimovanou C-Hyd.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., & Alderete, J. F. (1993). Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Biology*, 7(2), 299–309.
- Beltrán, N. C., Horváthová, L., Jedelský, P. L., Šedinová, M., Rada, P., Marcinčíková, M., Hrdý, I., & Tachezy, J. (2013). Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PloS One*, 8(5), e65148.
- Benchimol, M., & de Souza, W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 422–425.
- Benchimol, M., Pereira, M. E., Elias, C. A., & de Souza, W. (1981). Cell surface carbohydrates in *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Protozoology*, 28(3), 337–341.
- Benchimol, M., Aquino Almeida, J. C., & de Souza, W. (1996). Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue and Cell*, 28(3), 287–299.
- Boxma, B., Ricard, G., van Hoek, A. H. A. M., Severing, E., Moon-van der Staay, S.-Y., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., de Graaf, R. M., Cremers, G., Kwantes, M., McEwan, N. R., Newbold, C. J., Jouany, J.-P., Michalowski, T., Pristas, P., Huynen, M. A., & Hackstein, J. H. P. (2007). The [FeFe] hydrogenase of *Nyctotherus ovalis* has a chimeric origin. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 230.
- Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E., & Johnson, P. J. (1997). Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *The EMBO Journal*, 16(12), 3484–3493.
- Brugerolle, G. (1972). Caractérisation ultrastructurale et cytochimique de deux types de granules cytoplasmiques chez les *Trichomonas*. *Protistologica*, 8, 353–363.
- Brugerolle, G. (1975). Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenese de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de Trichomonadines primitives. *Protistologica*, 11, 457–468.
- Brugerolle, G. (1975–1976). Cytologie ultrastructurale, systématique et évolution des Trichomonadida. *Annales de la Station Biologique de Besse-en-Chandesse*, 10, 1–57.
- Brugerolle, G. (1991). Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates – Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma*, 164(1–3), 70–90.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(2), 94–113.
- Bui, E. T. N., Bradley, P. J., & Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 9651–9656.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., Van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P., & Friedrich, B. (2005). [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10(2–4), 181–196.

Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C. M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q. H., Paulsen, I., Zhang, H. B., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vaňáčová, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perte, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdý, I., Horváthová, L., Zubáčová, Z., Doležal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M. & Johnson, P. J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207–212.

Cavillier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews*, 57(4), 953–994.

Clark, C. G., & Roger, A. J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6518–6521.

Clemens, D. L., & Johnson, P. J. (2000). Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106, 307–313.

Constant, P., Chowdhury, S. P., Hesse, L., Pratscher, J., & Conrad, R. (2011). Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6027–6035.

Coombs, G., & Müller, M. (1995). Energy metabolism in anaerobic protozoa. In J. J. Marr & M. Müller (eds.), *Biochemistry and molecular biology of parasites*. Academic Press Ltd., 33–47.

Cotch, M. F., Pastorek, J. G., Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., ... Rhoads, G. G. (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually Transmitted Diseases*, 24(6), 353–360.

Čerkasovová, A., Lukášová, G., Čerkasov, J., & Kulda, J. (1973). Biochemical characterisation of large granule fraction of *Trichomonas foetus* (strain KV1). *Journal of Protozoology* 20, 535 - 535.

Davidson, E. A., van der Giezen, M., Horner, D. S., Embley, T. M., & Howe, C. J. (2002). An [Fe] hydrogenase from the anaerobic hydrogenosome-containing fungus *Neocallimastix frontalis* L2. *Gene*, 296(1–2), 45–52.

De Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., & Fernandez, V. M. (1997). Infrared spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical Society*, 119(31), 7181–7189.

Delgadillo, M. G., Liston, D. R., Niazi, K., & Johnson, P. J. (1997). Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 4716–4720.

Doležal, P., Vaňáčová, S., Tachezy, J., & Hrdý, I. (2004). Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene*, 329, 81–92.

Drmota, T., & Král, J. (1997). Karyotype of *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Protistology*, 33(2), 131–135.

Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., & Tachezy, J. (1996). Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83, 221–234.

Dyall, S. D., Yan, W., Delgadillo-Correa, M. G., Lunceford, A., Loo, J. A., Clarke, C. F., & Johnson, P. J. (2004). Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature*, 431, 1103–1107.

- Ellis, J. E., Yarlett, N., Cole, D., Humphreys, M. J., & Lloyd, D. (1994). Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology*, 140, 2489–2494.
- Fontecilla-Camps, J. C., Vobeda, A., Cavazza, C., & Nicolet, Y. (2007). Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chemical Reviews*, 107(10), 4273–4303.
- Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., & Spahn, C. M. (2011). The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 479(7372), 249–252.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7(5), 557–566.
- Germot, A., Philippe, H., & Le Guyader, H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14614–14617.
- Germot, A., Philippe, H., & Le Guyader, H. (1997). Evidence for loss of mitochondria in microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87, 159–168.
- Gorrel, T. E., Yarlett, N., & Müller, M. (1984). Isolation and characterization of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin. *Carlsberg Research Communications*, 49(2), 259–268.
- Halliwell, B. (1989). Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 747–752.
- Happe, T., & Kaminski, A. (2002). Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 1022–1032.
- Hashimoto, T., Sánchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M., & Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6860–6865.
- Higuchi, Y., Yagi, T., & Yasuoka, N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 5(12), 1671–1680.
- Honigberg, B. M., & Brugerolle, G. (1989). Structure. In B. M. Honigberg (ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, N.Y., 235–245.
- Honigberg, B. M., & King, V. M. (1964). Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *The Journal of Parasitology*, 50(3), 345–364.
- Honigberg, B. M., Volkmann, D., Entzeroth, R., & Scholtyseck, E. (1984). A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donné and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *The Journal of Protozoology*, 31 (1), 116–131.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995a). Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Molecular Evolution*, 41(3), 388–396.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995b). Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(5), 593–603.
- Hrdý, I., Hirt, R. P., Doležal, P., Bardoňová, L., Foster, P. G., Tachezy, J., & Embley, T. M. (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*, 432, 618–622.

- Hrdý, I., Tachezy, J., & Müller, M. (2007). Metabolism of trichomonad hydrogenosomes. In J. Tachezy (ed.) *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*. Microbiology Monographs, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jenkins, T. M., Gorrell, T. E., Müller, M., & Weitzman, P. D. J. (1991). Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 179(2), 892-896.
- Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Xu, F., Hjort, K., Ek, B., Steinhäuf, D., Hultenby, K., Bergquist, J., Andersson, J. O., & Svärd, S. G. (2013). Hydrogenosomes in the diplomonad *Spironucleus salmonicida*. *Nature Communications*, 4, 2493.
- Johnson, P. J., D'Oliveira, C. E., Gorrell, T. E., & Müller, M. (1990). Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6097-6101.
- Johnson, P. J., Lahti, C. J., & Bradley, P. J. (1993). Biogenesis of the hydrogenosome in anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Parasitology*, 79(5), 664-670.
- Johnson, P. J., Bradley, P. J. and Lahti, C. J. (1995) Cell Biology of Trichomonads: Protein targeting to the hydrogenosome. In Boothroyd, J. C. and Komuniecki, R. (eds). *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley-Liss, New York, 399-411.
- Keeling, P. J. (1998). A kingdom's progress: Archezoa and the origin of eukaryotes. *BioEssays*, 20(1), 87-95.
- Kleinhues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., & Friedrich, B. (2000). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 16-24.
- Krieger, J. N. (1989). Epidemiology and clinical manifestation of urogenital trichomoniasis in men. In B. M. Honigberg (ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, N.Y., 235-245.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., & Lancaster, C. R. (2002). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553(1-2), 23-38.
- Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P., & Swartz, J. R. (2010). High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PloS One*, 5(11), e15491.
- Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, 29(2), 199-212.
- Lahti, C. J. & Johnson, P. J. (1991). *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46(2), 307-310.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., ... Piot, P. (1993). Non-ulcerative sexually-transmitted diseases as risk-factors for HIV-1 transmission in women - Results from a cohort study. *AIDS*, 7, 95-102.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F., & Duchêne, M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular Microbiology*, 72(2), 518-536.
- Lindmark, D. G., & Müller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(22), 7724-7728.

- Lloyd, D., & Kristensen, B. (1985). Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of General Microbiology*, 131, 849–853.
- Lloyd, D., & Pedersen, J. Z. (1985). Metronidazole radical anion generation in vivo in *Trichomonas vaginalis*: oxygen quenching is enhanced in a drug-resistant strain. *The Journal of General Microbiology*, 134, 87–92.
- Lloyd, D., Lindmark, D. G., & Müller, M. (1979a). Adenosine triphosphatase activity of *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of General Microbiology*, 115, 301–307.
- Lloyd, D., Lindmark, D. G., & Müller, M. (1979b). Respiration of *Tritrichomonas foetus*: absence of detectable cytochromes. *The Journal of Parasitology*, 65(3), 466–469.
- Lossick, J. G. (1989). Therapy of urogenital trichomoniasis. In B. M. Honigberg (ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, N.Y., 324–341.
- Ma, K., Weiss, R., & Adams, M. W. (2000). Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1864–1871.
- Marques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A., & Matias, P. M. (2010). The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: a hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state. *Journal of Molecular Biology*, 396(4), 893–907.
- McGonigle, S., Dalton, J. P., & James, E. R. (1998). Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitology Today*, 14(4), 139–145.
- Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R., & Metcalf, W. W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5632–5637.
- Meyer, J. (2007). [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(9), 1063–84.
- Meyer, J., & Gagnon, J. (1991). Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry*, 30(40), 9697–9704.
- Müller, M. (1973). Biochemical cytology of trichomonad flagellates I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Cell Biology*, 57, 453–474.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 2879–2889.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7(1), 13–23.
- Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C., & Fontecave, M. (2010). Maturation of [FeFe]-hydrogenases: structures and mechanisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10750–10760.
- Nishihara, H., Miyashita, Y., Aoyama, K., Kodama, T., Igarashi, Y., & Takamura, Y. (1997). Characterization of an extremely thermophilic and oxygen-stable membrane-bound hydrogenase from a marine hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(3), 766–770.
- Nixon, J. E. J., Field, J., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Yarlett, N., Loftus, B. J., & Samuelson, J. (2003). Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *The Biological Bulletin*, 204(1), 1–9.

- Nývtlová, E., Šuťák, R., Harant, K., Šedinová, M., Hrdý, I., Pačes, J., Vlček, Č., & Tachezy, J. (2013). A NIF-type iron-sulfur cluster assembly system is duplicated and distributed in the mitochondria and cytosol of *Mastigamoeba balamuthi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7371–7376.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K. & Higuchi, Y. (2005). Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure*, 13(11), 1635–1642.
- Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2009). [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Transactions*, (37), 7577–7587.
- Paget, T. A., & Lloyd, D. (1990). *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41(1), 65–72.
- Payne, M. J., Chapman, A., & Cammack, R. (1993). Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Letters*, 317(1), 101–104.
- Peters, J. W. (1999). Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 670–676.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., & Seefeldt, L. C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 282(5395), 1853–1858.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 300–317.
- Pfanner, N., & Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(5), 339–349.
- Plümper, E., Bradley, P. J., & Johnson, P. J. (1998). Implications of protein import on the origin of hydrogenosomes. *Protist*, 149(4), 303–11.
- Plümper, E., Bradley, P. J., & Johnson, P. J. (2000). Competition and protease sensitivity assays provide evidence for the existence of a hydrogenosomal protein import machinery in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106, 11–20.
- Pohorelic, B. K., Voordouw, J. K., Lojou, E., Dolla, A., Harder, J., & Voordouw, G. (2002). Effects of deletion of genes encoding Fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 679–686.
- Pütz, S., Gelius-Dietrich, G., Piotrowski, M., & Henze, K. (2005). Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 142(2), 212–223.
- Pütz, S., Doležal, P., Gelius-Dietrich, G., Boháčová, L., Tachezy, J., & Henze, K. (2006). Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 579–586.
- Quon, D. V., D'Oliveira, C. E., & Johnson, P. J. (1992). Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 4402–4406.
- Rada, P., Doležal, P., Jedelský, P. L., Bursac, D., Perry, A. J., Šedinová, M., Smíšková, K., Novotný, M., Beltrán, N. C., Hrdý, I., Lithgow, T., & Tachezy, J. (2011). The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PloS One*, 6(9), e24428.
- Rein, M. F. (1989). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In B. M. Honigberg (ed.), *Trichomonads parasitic in humans*. Springer-Verlag, New York, N.Y., 225–234.

- Roger, A. J., Clark, C. G., & Doolittle, W. F. (1996). A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14618–14622.
- Samuels, R. (1980). Chromosome morphology of *Tritrichomonas augusta*. *The Journal of Protozoology*, 27(3), A39–A40.
- Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyll, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A., & Johnson, P. J. (2011). The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *International Journal for Parasitology*, 41, 1421–1434.
- Schut, G. J., & Adams, M. W. (2009). The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4451–4457.
- Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H., & Higuchi, Y. (2011). Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature*, 479(7372), 253–256.
- Smutná, T., Gonçalves, V. L., Saraiva, L. M., Tachezy, J., Teixeira, M., & Hrdý, I. (2009). Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryotic Cell*, 8(1), 47–55.
- Sogin, M. L. (1997). History assignment: When was the mitochondrion founded? *Current Opinion in Genetics and Development*, 7(6), 792–799.
- Soltys, B. J., & Gupta, R. S. (1994). Presence and cellular distribution of a 60-kDa protein related to mitochondrial Hsp60 in *Giardia lamblia*. *Journal of Parasitology*, 80(4), 580–590.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., & Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1–20.
- Tsaousis, A. D., Nývltová, E., Šuřák, R., Hrdý, I., & Tachezy, J. (2014). A nonmitochondrial hydrogen production in *Naegleria gruberi*. *Genome Biology and Evolution*, 6(4), 792–799.
- Turner, G., & Müller, M. (1983). Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Parasitology*, 69(1), 234–236.
- Verhagen, M. F., O'Rourke, T., & Adams, M. W. (1999). The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid sequence analyses versus biochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1412(3), 212–229.
- Vidakovic, M. S., Fracziewicz, G., & Germanas, J. P. (1996). Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 14734–14739.
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206–4272.
- Vignais, P. M., & Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 159–188.
- Vignais, P. M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 455–501.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373(6515), 580–587.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 118(51), 12989–12996.

Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P., Garcin, E., Rousset, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (2005). Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(3), 239-249.

Williams, K., Lowe, P. N., & Leadlay, P. F. (1987). Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *The Biochemical Journal*, 246, 529-536.

World Health Organization. (2012). *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008* (p. 20).

Yagi, T., & Higuchi, Y. (2013). Studies on hydrogenase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 89(1), 16-33.

Yagi, T., Kimura, K., Daidoji, H., Sakai, F., & Tamura, S. (1976). Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki. *Journal of Biochemistry*, 79(3), 661-671.

Yagi, T., Kimura, K., & Inokuchi, H. (1985). Analysis of the active center of hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki by magnetic measurements. *The Journal of Biochemistry*, 97, 181-187.