

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



Studijní program: Biochemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Dominik Arbon

Studijní obor: Biochemie

Vliv iontů železa na metabolismus prvoka *Trypanosoma brucei*

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a konzultanta RNDr. Róberta Šuťáka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto děkuji Mgr. Janu Machovi, Ph.D. a RNDr. Róbertu Šuťákovi, Ph.D. za jejich ochotu a vstřícnost během psaní mé bakalářské práce a doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za veškeré rady. Dále bych rád poděkoval celé své rodině a přátelům za jejich podporu.

Abstrakt

Ionty železa jsou esenciální součástí správné funkce mnoha buněčných dějů. Jejich utilizace je buňkou striktně regulována, a narušení těchto procesů vede až k možné destrukci buňky. Ionty železa se v organismech nevyskytují volně, ale jsou vždy vázány na proteiny určené k jejich uskladnění a transportu nebo jako součást katalytických center enzymů. Transport iontů železa do buňky a mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty je zásadní pro správné fungování buňky. V nedávné době byl popsán mitochondriální přenašeč iontů železa u kvasinky, který je nezbytný pro syntézu železosírných center využívaných jako koenzymy. V této práci je zkoumána lokalizace a funkce homologu tohoto přenašeče u parazitického organismu *Trypanosoma brucei*, který způsobuje onemocnění africká trypanosomiáza, známé jako spavá nemoc. Tento parazit je zcela závislý na příjmu iontů železa ze svého hostitele, a proto je utilizace iontů železa zkoumána jako potenciální cíl pro možný terapeutický zásah.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci proteinu Mcp17, u kterého se předpokládá, že se podílí na přenosu iontů železa do mitochondrie *T. brucei*. Pomocí exprese značeného Mcp17 byla potvrzena mitochondriální lokalizace proteinu u *T. brucei*. Měřením aktivit vybraných enzymů bylo zjištěno, že buňky s inhibovanou expresí genu *mcp17* vykazovaly významně sníženou aktivitu enzymů obsahujících železosírné centrum jako kofaktor.

Klíčová slova: *Trypanosoma brucei*, metabolismus, ionty železa

Abstract

Iron ions are essential components of numerous cell processes. Their utilisation is strictly regulated, since any impairment can have devastating effect on the cell. In living organisms, iron ions are bound to proteins, for storage, transportation, or as a vital part of catalytic centers of enzymes. Transportation of iron ions between different compartments is important for the correct function of the cell. It was recently shown on yeast, how a mitochondrial transporter of iron ions is essential for the synthesis of iron-sulfur clusters of enzymes. This work aims to describe the localization and function of a homologous protein of a parasitical organism *Trypanosoma brucei*, which causes African trypanosomiasis, also known as sleeping sickness. This parasite is entirely dependent on uptake of iron ions from its host and therefore the utilization of iron ions is studied as a potential therapeutic target.

This work is focused on the characterization of protein Mcp17, which is assumed to function as a transporter of iron ions into the mitochondria of *T. brucei*. Utilizing expression of marked Mcp17, the transporter was confirmed to be localized on the mitochondrial membrane of the cell. Measuring of enzyme activity of selected enzymes indicated that cells with inhibited expression of the gene *mcp17* exhibited significantly decreased enzyme activities of enzymes that contained iron-sulfur cluster as a co-factor.

(In Czech)

Keywords: *Trypanosoma brucei*, metabolism, iron ions

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1. TEORETICKÝ ÚVOD	10
1.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.1.1 Zdravotnický a ekonomický význam	11
1.1.2 Antigenní variabilita	12
1.1.3 Životní cyklus	12
1.1.4 Morfologie	14
1.1.4.1 Kinetoplast	14
1.1.4.2 Orgány energetického metabolismu	15
1.2 Energetický metabolismus	15
1.3 Příjem a užití iontů železa <i>T. brucei</i>	17
1.3.1 Příjem iontů železa	18
1.3.2 Hem	20
1.3.3 Železosírná centra	21
1.4 Enzymy	23
1.4.1 Pyruvátkinasa EC 2.7.1.40	23
1.4.2 Threonindehydrogenasa EC 1.1.1.103	23
1.4.3 Fumarasa EC 4.2.1.2	23
1.4.4 Akonitasa EC 4.2.1.3	24
1.4.5 Sukcinátdehydrogenasa EC 1.3.5.1	24
2. CÍL PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODY	26
3.1 Buněčný materiál	26
3.2 Materiál a chemikálie	26
3.3 Přístroje	29

3.4 Metody.....	30
3.4.1 Kultivace <i>T. brucei</i>	30
3.4.2 Růstová křivka.....	31
3.4.3 Lokalizace proteinu Mcp17	31
3.4.4 Digitoninová frakcionace buněk	33
3.4.4.1 Příprava buněk na frakcionaci	33
3.4.4.2 Určení množství proteinů	33
3.4.4.3 Preparativní frakcionace	34
3.4.5 Měření aktivit enzymů	35
3.4.5.1 Stanovení aktivity pyruvátkinasy EC 2.7.1.40.....	36
3.4.5.2 Stanovení aktivity threonindehydrogenasy EC 1.1.1.103	37
3.4.5.3 Stanovení aktivity fumarasy EC 4.2.1.2	38
3.4.5.4 Stanovení aktivity akonitasy EC 4.2.1.3	39
3.4.5.5 Stanovení aktivity sukcinátdehydrogenasy EC 1.3.5.1	40
3.4.6 Zpracování výsledků.....	40
4. VÝSLEDKY	41
4.1 Růstová křivka	41
4.2 Lokalizace proteinu Mcp17.....	42
4.3 Aktivita enzymů.....	43
5. DISKUSE.....	45
6. ZÁVĚR	47
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

Seznam použitých zkratek

1,3 BPGA	1,3-bifosfoglycerát
3-PGA	3-fosfoglycerát
AA	aminokyselina
ADP	adenosindifosfát
AKO	akonitasa
AMP	adenosinmonofosfát
AOX	alternativní oxidasa
ApoL1	apolipoprotein L1
Atm	mitochondriální ABC transportér ATM
ATP	adenosintrifosfát
BCA	metoda pro stanovení množství proteinů „Bicinchronic acid kit“
BSA	bovinní sérový albumin
CIA	cytosolická dráha skládání proteinů obsahujících železosirná centra „cytosolic iron-sulfur cluster assembly“
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DCPIP	2,6-Dichlorofenolindofenol
DHAP	dihydroxyaceton fosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F-6-P	fruktosa-6-fosfát
FAD	flavinadenindinukleotid, oxidovaná forma

FADH2	flavinadenindinukleotid, redukováaná forma
FBP	fruktosa-1,6-bisfosfát
FBS	fetální bovinní sérum
FdR	NADH ferredoxin reduktáza
FdxA	ferredoxin A
FUM	fumarasa
G-3-P	glyceraldehyd-3-fosfát
G-6-P	glukosa-6-fosfát
Gly-3-P	glycerol-3-fosfát
HAT	lidská africká trypanosomiáza „Human African Trypanosomiasis“
HBSS	fyzilogický roztok solí „Hank's balanced salt solution“
HDL	vysokodenzní lipoprotein „High Density Lipoprotein“
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonová
HpHbR	haptoglobin-hemoglobinový receptor
Hpr	hemoglobin vázající protein „haptoglobin related protein“
Hsp70	chaperon „heat shock protein“
IRP-1	regulační protein iontů železa „Iron regulatory protein-1“
ISC	mitochondriální dráha skládání proteinů obsahujících železosirná centra „Mitochondrial iron-sulfur cluster assembly“
IscU	enzym skládající železosirná centra „iron-sulfur cluster assembly enzyme“
LDH	laktátdehydrogenasa
<i>mcp17</i>	gen kódující protein Mcp17
Mcp17	mitochondriální transportní protein „Mitochondrial carrier protein“

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid, redukovaná forma
Nar1 a Cia1	přenašeče železosirných center
Nbp35-Cfd1	molekulární lešení skladby železosirných center v cytosolu
OA	2-oxokyselina
PBS	fosfátový pufr „phosphate-buffered saline“
PEP	fosfoenolpyruvát
Pi	anorganický fosfát
PPi	anorganický difosfát
PYK	pyruvátkinasa
SDH	sukcinátdehydrogenasa
SDM-79	růstové médium
SHE	sacharosa-HEPES-EDTA
SucCoA	sukcinyl koenzym A
TbHrg	hemový transportér T.brucei „T. brucei heme-responsive gene protein“
TDH	threonindehydrogenasa
TfR	transferinový receptor
TLF	trypanosomální lytický faktor
VSG	variabilní povrchový glykoprotein „variable surface glycoprotein“

1. Teoretický úvod

1.1 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je jednobuněčný eukaryotický organismus spadající do řádu Trypanosomatida. Obdobně jako další zástupci tohoto rodu se jedná o obligátního endoparazita, jehož životní cyklus je zcela vázaný na savčího a hmyzího hostitele, v kterých probíhá jeho vývoj i množení. *T. brucei* způsobuje u zvířat onemocnění nazývané „zvířecí africká trypanosomiáza“, známé pod názvem nagana. Vyskytuje se především u dobytka, známé jsou však rozšířené nákazy i velbloudů, koz nebo psů. Oblast výskytu tohoto parazita je blízce spjata s rozšířením jeho hlavního přenašeče, zástupců rodu *Glossina*, známých také pod názvem „moucha tse-tse“ [1]. Africká trypanosomiáza se vyskytuje především v oblasti tzv. „glosinového pásu“. To je oblast ležící z velké části v centrální Africe, zasahující i do východní a západní Afriky.

Existují tři poddruhy *T. brucei*: *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* a *T. brucei gambiense*. Zatímco *T. b. brucei* způsobuje trypanosomiázu u zvířat, *T. b. rhodesiense* a *T. b. gambiense* vyvolávají také trypanosomiázu u člověka, onemocnění známé pod názvem „spavá nemoc“ nebo HAT. Onemocnění může probíhat několik let a bez odpovídající léčby je smrtelné [2] [3].

T. b. brucei se vyskytuje ve východní i západní části Afriky. Přenášena je podrodem lesních glosin, které se vyskytují v zalesněných západních oblastech Afriky. Způsobuje africkou zvířecí trypanosomiázu.

T. b. gambiense se vyskytuje zejména v západní části Afriky, poblíž vodních zdrojů, kde je přenášena říčním podrodem mouchy tse-tse. Způsobuje západoafrickou, neboli chronickou, spavou nemoc. Hlavní hostitel je člověk, dokáže však také napadnout další savce, zejména domácí zvířata.

T. b. rhodesiense se vyskytuje ve východní části Afriky, v oblastech savan. Je přenášena savanovým podrodem mouchy tse-tse, které sají převážně na velkých zvířatech (antilopy, buvoli). U člověka způsobuje oportunní nákazou akutní formu africké trypanosomiázy [3].

I přes to, že jsou oba poddruhy morfologicky nerozeznatelné, onemocnění vyvolané *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense* má jiný průběh [4]. *T. b. gambiense* způsobuje typický trypanosomální šankr, což je typický lokální zánět v místě průniku parazita do těla, následuje zvětšení uzlin během několika týdnů po nákaze. Po několika měsících až letech následuje invaze do mozkomíšního moku, která se projevuje typickými příznaky silných bolestí hlavy a poruchou spánkového rytmu. Invaze centrálního nervového systému (CNS) parazitem vede ke komatózním stavům a bez léčby může skončit smrtí pacienta. Nákaza *T. b. rhodesiense* je vzácnější a má rychlejší a dramatičtější průběh. Počátek nákazy je obdobný jako u *T. b. gambiense*, ale během několika týdnů se parazit rapidně rozšíří po těle, což způsobuje horečnaté stavy, bolesti hlavy, zduření mízních uzlin a potencionálně fatální otoky srdce a plic. Následná invaze CNS způsobuje kóma a smrt [3].

1.1.1 Zdravotnický a ekonomický význam

Na člověka má ze zdravotnického hlediska *T. brucei brucei* zanedbatelný zdravotnický význam, protože se v lidském séru nachází trypanosomální lytický faktor (TLF, „trypanosome lytic factor“), který poskytuje člověku vrozenou imunitu [5]. TLF jsou částice lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL, tzv. high density lipoproteins), obsahující apolipoprotein L1 (ApoL1) a hemoglobin vázající protein (Hpr, haptoglobin related protein) [6]. Faktor TLF-1 je v krvi parazitem endocytován skrz receptor HpHbR na flagelární kapse (stejný receptor jako pro příjem hemoglobin-haptoglobinového komplexu viz obrázek 5, str. 18) a přesouvá se do lyzozomů [7]. Postupná akumulace a následné okyselení vede k tvorbě otvorů v lyzosomech a uvolnění vlastních hydrolytických enzymů trypanosomy, které parazita usmrtí [8]. Poddruhy *T. b. rhodesiense*, a *T. b. gambiense* selektivně neendocytují TLF-1, čímž se stávají vůči lidskému séru resistantní a jsou schopné nakazit člověka [9].

Africká zvířecí trypanosomiáza postihuje divoká i domácí zvířata. V rozvojových zemích Afriky páchá velké hospodářské škody, protože u dobytka vyvolává nemoc, způsobující celkové oslabení organismu a ve většině případů je smrtelná [10]. Přenos mezi jednotlivci ve stádech je prakticky nevyhnutelný, moucha tse-tse infikuje víc kusů dobytka, z kterých se zároveň infikují další přenašeči.

Léčba zvířat je možná, je však finančně nákladná a nedokonalá, léčené zvíře může mít doživotní následky ve formě chudokrevnosti a ztráty tělesné hmotnosti, čímž se stává hospodářsky většinou dále nevyužitelné. Jako u mnoha parazitárních onemocnění, nejsou k dispozici dostatečné finanční zdroje na efektivní boj proti zvířecí africké trypanosomiáze [11].

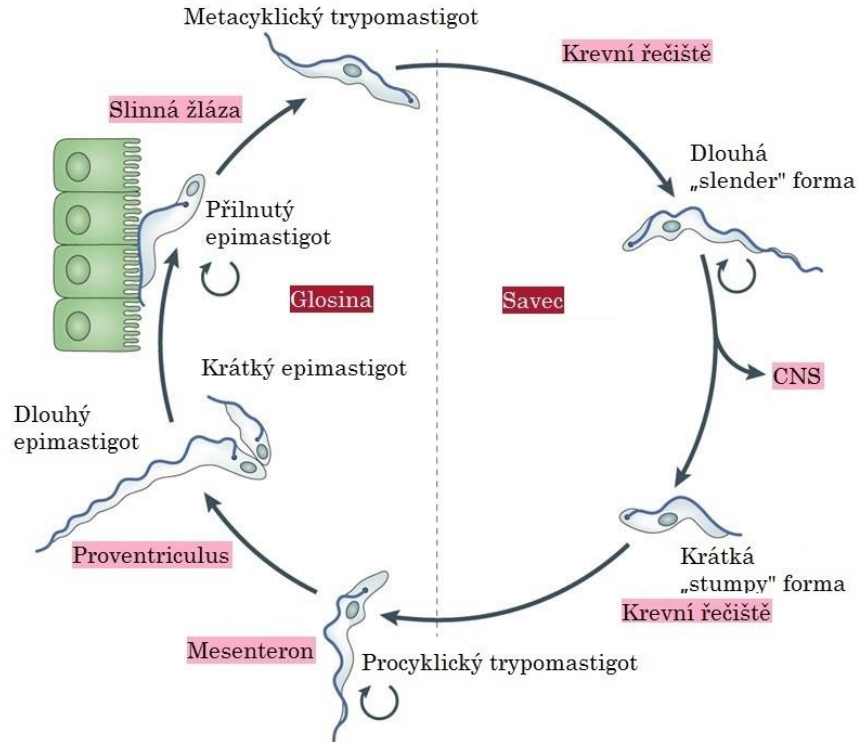
1.1.2 Antigenní variabilita

Jednou z význačných vlastností afrických trypanosom je jejich schopnost změnit svoje povrchové antigeny. Povrch buněk *T. brucei* je pokryt tlustou vrstvou glykoproteinů, nazývaných variabilní povrchové glykoproteiny (VSG, „variant surface glycoprotein“). Ty v krvi savce fungují jako antigeny pro hostitelské protilátky. Zatímco imunitní systém hostitele rozpozná, napadne a zlikviduje všechny buňky parazita s majoritním druhem antigenu, část parazitů s minoritním druhem povrchového glykoproteinu unikne imunitní odpovědi a může se znovu množit, dokud hostitel nevytvoří nové specifické protilátky. Zničené buňky parazita i imunitního systému způsobují značnou zátěž pro organismus a jsou ve velké míře zodpovědné za projevy nákazy. Tento proces se neustále opakuje, dokud nedojde k selhání imunitního systému a vyčerpání hostitelského organismu [12]. Trypanosomy využívají unikátního mechanismu antigenní variability, kdy jsou geny VSG exprimovány pouze na jediném expresním místě v genomu. Povrch buňky je pokryt vždy pouze jedním druhem VSG. Aktivace exprese jiného VSG vede k naprosté změně glykoproteinového povrchu buňky a tím k odlišení antigenové stopy jedince [13].

1.1.3 Životní cyklus

Životní cyklus *T. brucei* je vázán na dva hostitele. Vzhledem k podstatné odlišnosti biologického prostředí mezi savcem a mouchou tse-tse se musí tento parazit adaptovat na rozdílné podmínky svého momentálního hostitele. K množení dochází v hlavním hostiteli i v přenašeči, a to binárním dělením, jak je typické pro jednobuněčné organismy.

Obrázek 1, str. 13 mapuje životní cyklus *T. brucei*. Zatímco v savci se nachází tzv. krevní formy („bloodstream“ formy), v mouše tse-tse se vyskytují morfologicky odlišné, tzv. „procyklické“, formy [14].



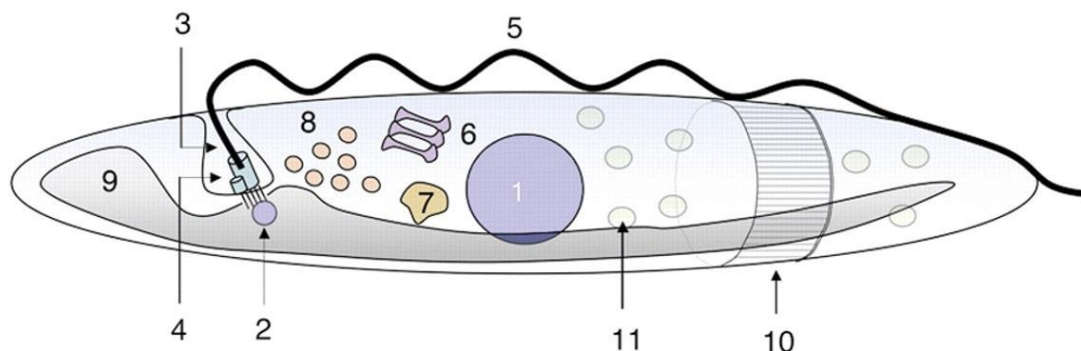
Obrázek 1, životní cyklus *T. brucei*. (CNS = centrální nervový systém). Převzato a upraveno z [15].

Do savce pronikne parazit ve formě metacyklického trypanastigota během sání krve mouchou tse-tse. Poté vstoupí do lymfatického systému, z kterého se dostane do krevního řečiště, kde diferencuje do dlouhé, tzv. „slender“ formy. Ta se krví a lymfatickým systémem dále rozšíří po těle hostitele [15]. Během invazivní fáze infekce dokáže parazit překonat hematoencefalickou membránu a proniknout do centrální nervové soustavy [16]. Slender forma se dále diferencuje na krátkou „stumpy“ formu, která se nedělí a je adaptována na přežití v přenašeči.

Zpět do hmyzího přenašeče vstupuje *T. brucei* opět během sání krve savce, kdy nasátá krev obsahuje mimo jiné i krátkou formu parazita. V mesenteronu hmyzu proběhne diferenciaci na procyklického trypanastigota, který se opět množí binárním dělením. Následně se přesune skrz mesenteron až do slinných žláz. Zde nastane asymetrické dělení, kdy z jednoho procyklického epimastigota vznikne jeden tzv. krátký a jeden tzv. dlouhý epimastigot, který se rozmnožuje. Krátká forma parazita se přichytí na epitel slinné žlázy, kde se dále dělí a ukončuje životní cyklus diferenciací na infekčního metacyklického trypanastigota. Při sání se uvolňuje ze slinných žláz a spolu se slinami proniká do savčího hostitele [15] [17].

1.1.4 Morfologie

Na obrázku 2 je zobrazena schematická struktura buňky *T. brucei*. Neobvyklou zvláštností je přítomnost pouze jedné mitochondrie na buňku. Trypanosoma má undulující membránu, což je část cytoplasmatické membrány propojená s volným bičíkem, jehož poloha se mění v závislosti na stádiu vývoje.



- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Nukleus | 7. Lyzosom |
| 2. Kinetoplast | 8. Endozom |
| 3. Flagelární kapsa | 9. Mitochondrie |
| 4. Bazální tělísko | 10. Cytoskelet |
| 5. Axonema a paraflagelární tělísko | 11. Glykosomy |
| 6. Golgiho aparát | |

Obrázek 2, schematická struktura buňky *T. brucei*, převzato a upraveno z [18]

1.1.4.1 Kinetoplast

Třída Kinetoplastea (bičivky), do které spadá i celý řád Trypanosomatida, se vyznačuje především přítomností kinetoplastu, což je mitochondriální úsek, kde je nahromaděna DNA v podobě konkatenovaných malých a velkých kruhových molekul. Velké kruhové molekuly DNA, tzv. „maxikroužky“, hrají podobnou roli jako mitochondriální DNA jiných eukaryot, kódují geny pro ribosomální RNA a některé mitochondriální proteiny [19]. Malé molekuly, tzv. „minikroužky“, kódují malé úseky RNA, tzv. guide RNA, která slouží k procesu RNA editace maxikroužků [19] [20].

1.1.4.2 Organely energetického metabolismu

V hmyzím hostiteli, kde není dostatečné množství glukosy, je využita mitochondriální dráha metabolismu. Buňka obsahuje jedinou síťovitě rozvětvenou mitochondrii, která zaplňuje velkou část buňky a vyznačuje se systémem diskoidálních krist [21]. Hlavní zdroj energie je v tomto případě přeměna aminokyselin. V krevní formě trypanosom je, z důvodu velké koncentrace glukosy v prostředí, glykolýza hlavní metabolická dráha [22]. Mitochondrie se zmenší a zaujímá tubulární formu téměř bez kryst [18]. Využitelná energie je tvořena především v glykosomech.

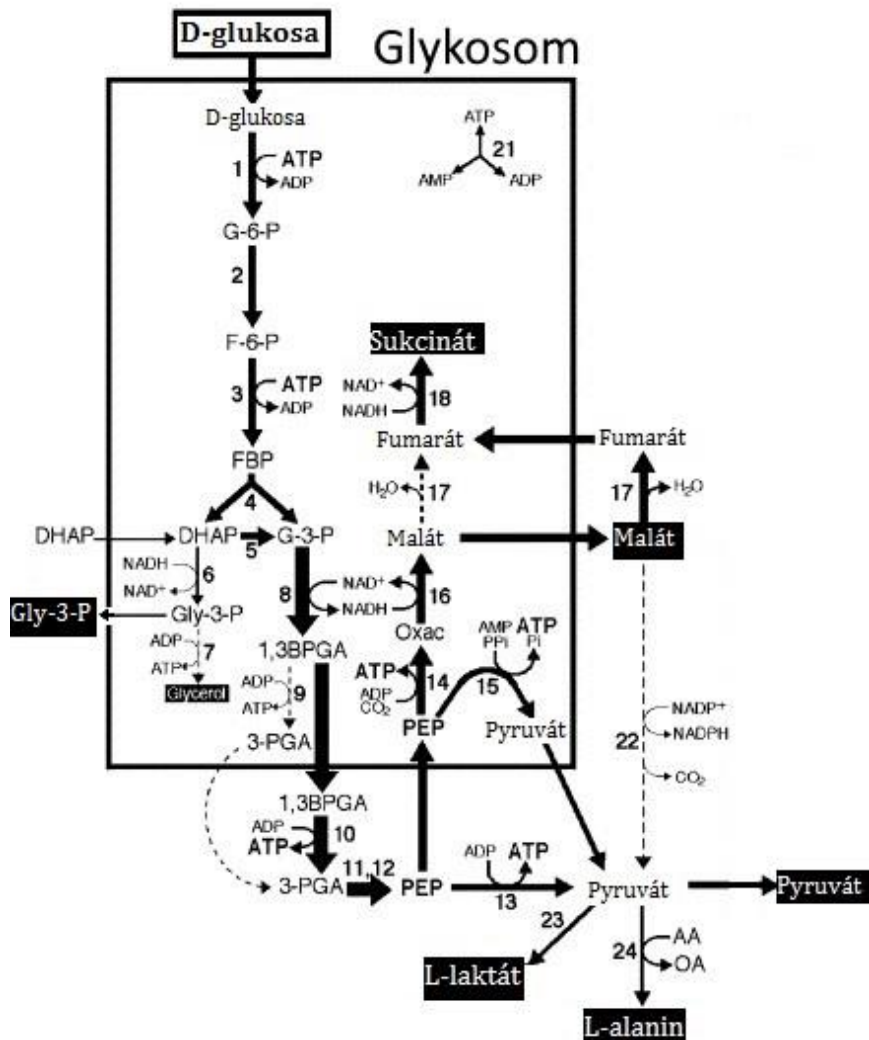
Glykosom je jednomembránová organela peroxisomálního původu obsahující prvních šest glykolytických enzymů. Zvláštní kompartmentalizace tohoto procesu je dána zvláštností enzymů hexokinasy a fosfofruktokinasy v tomto organismu, které nejsou zpětně regulované svými produkty. Izolací těchto enzymů do glykosomu je tato dráha omezena a nehrozí akumulace meziproduktů ani nadměrná spotřeba ATP [23].

1.2 Energetický metabolismus

V krvi savčího hostitele probíhá glykolýza v glykosomech, kde je glukosa metabolizována na 1,3-bifosfoglycerát a dokončena je v cytosolu, kde následuje přeměna na pyruvát, který je dále využíván například pro syntézu aminokyselin (viz obrázek 3, str. 16). Enzymy těchto procesů jsou přítomné i u hmyzí formy parazita.

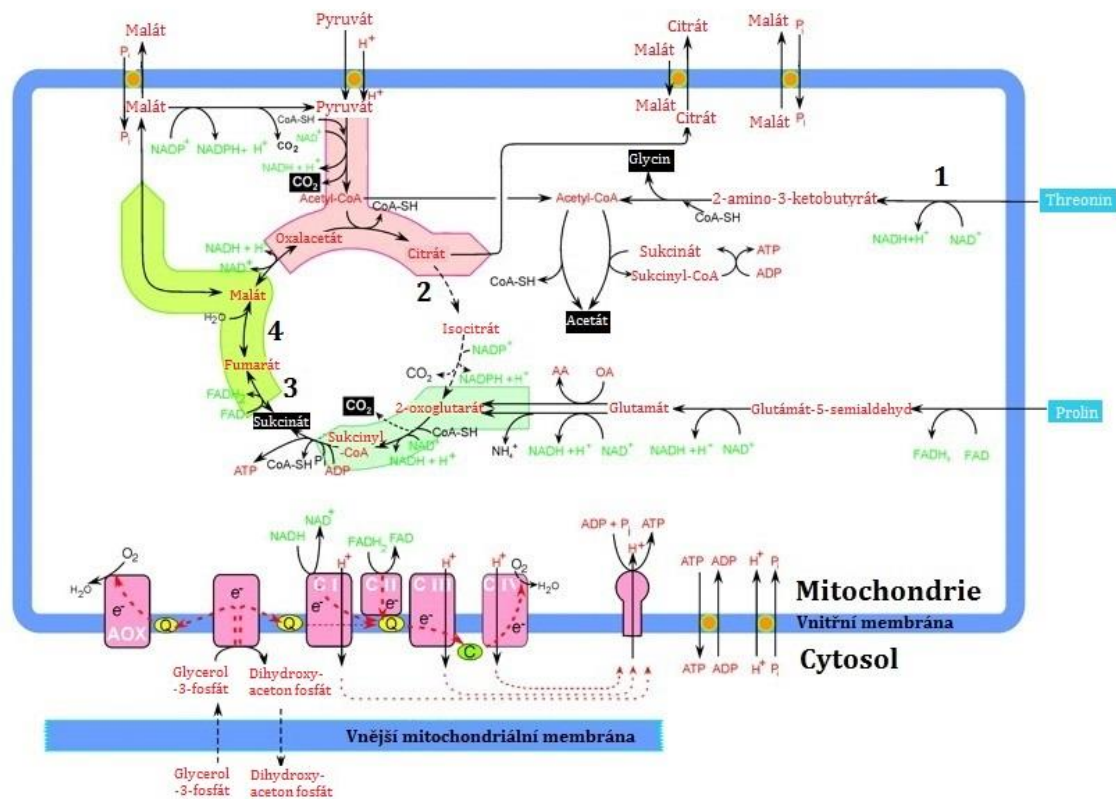
Ve střevech hmyzího vektora není glukosa přítomna v dostatečné koncentraci, proto využívá *T. brucei* v hmyzí formě jako zdroj energie především aminokyseliny threonin, prolin a glutamin. Parazit je přesto i v této formě schopen využít dostupnosti glukosy a glykolýza může probíhat podle schématu na obrázku 3, str. 16.

Krebsův cyklus u hmyzí formy *T. brucei* neprobíhá zcela jako cyklus. Na rozdíl od přeměny acetylkoenzymu A na oxid uhličitý u běžných mitochondrií, je acetylkoenzym A využíván ke zpracování aminokyselin na koncový produkt sukcinát a acetát, který je částečně dále využíván k syntéze mastných kyselin [24]. Schéma metabolismu je ukázáno na obrázku 4, str. 17.



Obrázek 3, všeobecné schéma metabolismu glukosy T. brucei. Čárkované šipky znázorňují reakce, které probíhají v zanedbatelné míře. Zkratky – AA, aminokyselina; 1,3BPGA, 1,3-bifosfoglycerát;

DHAP, dihydroxyaceton fosfát; F-6-P, fruktosa 6-fosfát; FBP, fruktosa 1,6-bisfosfát; G-3-P, glyceraldehyd 3-fosfát; G-6-P, glukosa 6-fosfát; Gly-3-P, glycerol 3-fosfát; OA, 2-oxokyselina; PEP, fosfoenolpyruvát; 3-PGA, 3-fosfoglycerát; Pi, anorganický fosfát; PPi, anorganický difosfát; SucCoA, sukcinyl koenzym A. Enzymy: 1, hexokinasa; 2, glukosa-6-fosfát isomerasa; 3, fosfofruktokinasa; 4, aldolasa; 5, triosafosátisomerasa; 6, glycerol-3-fosfátdehydrogenasa; 7, glycerolkinasa; 8, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; 9, 10, fosfoglycerátkinasa; 11, fosfoglycerátmutasa; 12, enolasa; 13, pyruvátfosfát dikinasa; 14, fosfoenolpyruvát karboxykinasa; 15, pyruvátkinasa; 16, malátdehydrogenasa; 17, fumarasa; 18, fumarátreduktasa; 21, adenylátkinasa; 22, malátdehydrogenasa; 23, neznámý enzym; 24, alaninaminotransferasa. Převzato a upraveno z [25].



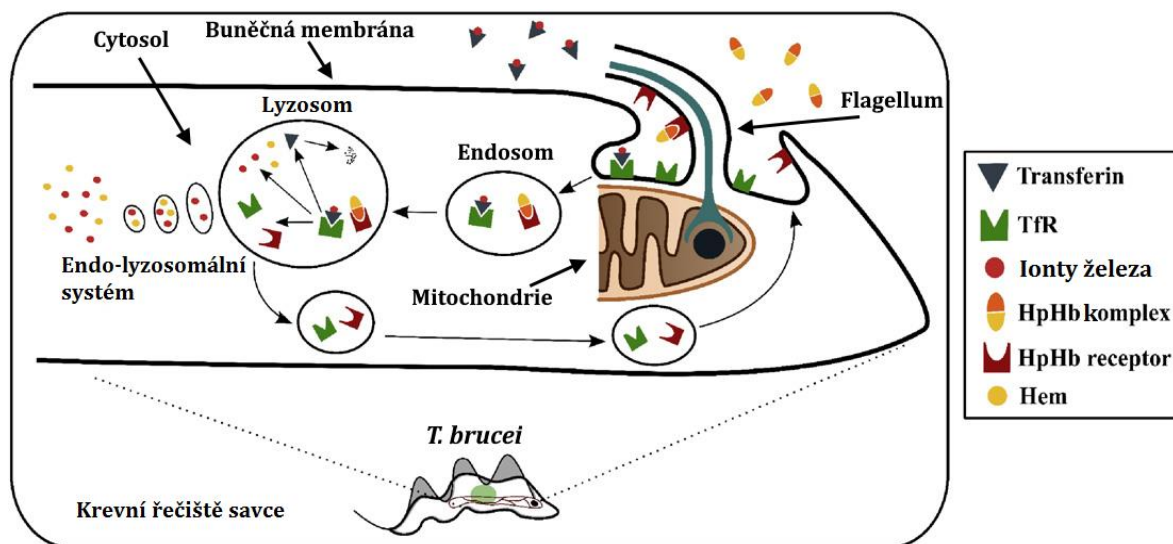
Obrázek 4, schéma metabolismu mitochondrie hmyzí formy *T. brucei*. Modře ohraničené jsou substráty, černě ohraničené jsou produkty. Čárkované šipky znázorňují reakce, které probíhají v zanedbatelné míře. Zkratky: AA, aminokyselina; Acetyl-CoA, acetylkoenzym A; AOX, alternativní oxidasa; OA, 2-oxokyselina; P_i, anorganický fosfát. Čísla označují enzymy: 1, threonindehydrogenasa; 2, Akonitasa; 3, Sukcinátdehydrogenasa; 4, fumarasa. Převzato a upraveno z [26].

1.3 Příjem a utilizace iontů železa *T. brucei*

Železo je významný biogenní prvek, který hraje nenahraditelnou roli v organismu. Jeho schopnost přechodu mezi dvěma stabilními oxidačními stavy ho činí významným účastníkem mnoha oxidačních a redukčních procesů. Mezi nejmarkantnější místo výskytu tohoto kovu v živých organismech patří hemová skupina, kde figuruje v reverzibilní vazbě kyslíku. Neméně významnou roli pak ionty železa a jejich sloučeniny hrají jako kofaktory různých enzymů a jako součást železosírných center, které figurují v mnoha metabolických procesech [27]. Nadbytek iontů železa je pro buňku nebezpečný především kvůli katalýze reakcí vedoucích ke vzniku volných radikálů.

1.3.1 Příjem iontů železa

V savčím hostiteli se *T. brucei* vyskytuje především v krvi, kde se nacházejí i proteiny figurující jako zdroje iontů železa. Jelikož je železo jeden z prvků nezbytně důležitých pro život parazitů, organismus hostitele se snaží zabránit volné dostupnosti těchto látek, jako součást obrany proti patogenům [27]. Ionty železa se proto v krvi nevyskytují volně, ale v konjugaci s proteiny ve formě laktoferinu nebo transferinu [28]. Právě transferin savčího hostitele využívají krevní formy trypanosom jako zdroj volných iontů železa. K příjmu dochází receptory zprostředkovanou endocytózou ve flagelární kapse (viz obrázek 2, str. 14) [29]. Nejprve se transferin naváže na specifický transferinový receptor (TfR) a dojde k endocytóze pomocí endosomů. Uvolnění transferinu a iontů železa z TfR nastane při okyselení endosomu během jeho přeměny na lyzozom. Zatímco TfR je regenerován a následně transportován zpět na buněčnou membránu, transferin bez koenzymu, tzv. apotransferin, je proteolyticky degradován v lyzosomech [29] [30]. Uvolněné ionty železa jsou přeneseny do cytosolu využitím transportních proteinů [31]. Schéma procesu je zobrazeno na obrázku 5.

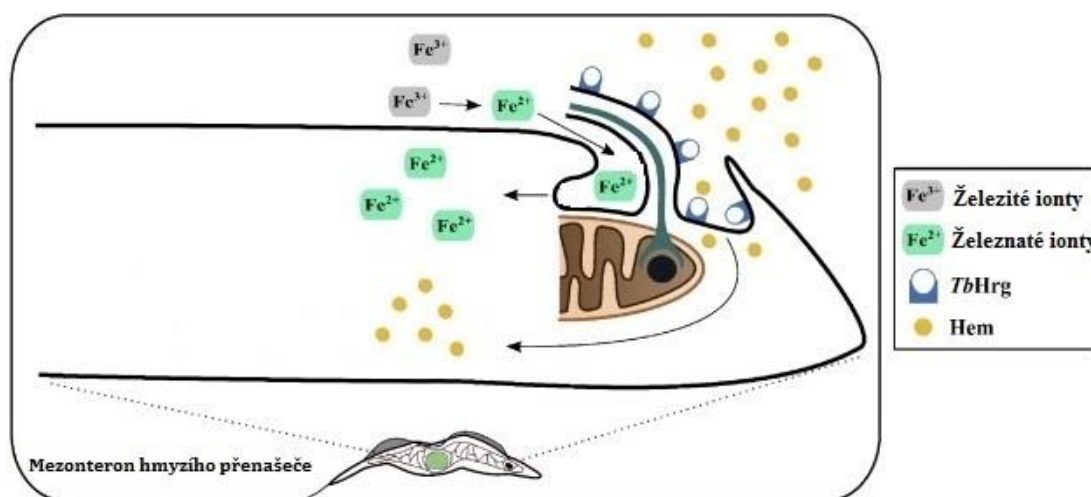


Obrázek 5, schéma příjmu iontů železa a hemu *T. brucei* v savčím hostiteli. Transferin je navázán na transferinový receptor (TfR), endocytován, a následné okyselení endosomu vede k rozpadu komplexu a uvolnění iontů železa. Ty jsou poté uvolněny do cytoplasmy skrz endo-lyzozomální systém. Uvolněné TfR jsou buňkou znovu využity. HpHb, haptoglobin-hemoglobin; TfR, transferinový receptor.

Převzato a upraveno z [32]

Ve hmyzím přenašeči probíhá příjem iontů železa z okolí odlišným způsobem než v savčím hostiteli. Důvodem je především nepřítomnost savčího transferinu a laktoferinu. Ty se zřejmě vyskytují pouze po velmi krátkou dobu po nasátí savčí krve [32]. Alternativním zdrojem se tedy stávají ionty železa navázané v komplexech, které se vyskytují v mesenteronu a v sacím ústrojí hmyzího hostitele. Způsob příjmu iontů probíhá tzv. redukčním způsobem ve dvou fázích. Nejprve jsou železité ionty na povrchu buňky enzymem Fe^{3+} -chelátreduktasou (EC 1.16.1.

7) redukovány na železnaté ionty a uvolněny z komplexu. Ve druhé fázi probíhá jejich transport skrz buněčnou membránu, do cytosolu parazita [33]. Schéma tohoto procesu je zobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 6, schéma příjmu iontů železa a hemu *T. brucei* ve hmyzím přenašeči. Železité ionty jsou nejdříve redukovány na železnaté, následně probíhá jejich transport v místě flagelární kapsy do cytosolu. Hem je přijímán pomocí specifického přenašeče. *TbHrg*, hemový transportér „*T. brucei* heme-responsive gene protein“. Převzato a upraveno z [32]

1.3.2 Hem

Hem je důležitá součást mnoha enzymů, které figurují v klíčových buněčných pochodech. U trypanosomy je využit především v cytochromech dýchacího řetězce [32]. Podstatou jeho funkce je schopnost iontu železa, navázaného v pyrrolových kruzích, přecházet mezi dvěma oxidačními stavy (Fe^{2+} a Fe^{3+}) [34]. Na rozdíl od většiny organismů závislých na aerobní respiraci postrádají trypanosomy enzymy nezbytné pro syntézu hemu *de novo* [35] a jsou odkázány na hem ze svého okolí. Trypanosomy také nemají enzym hemoxigenasu a tudíž nedokáží hem ani štěpit a získat z něj ionty železa [36].

V savčím hostiteli je hem dostupný ve formě haptoglobin-hemoglobinového komplexu [37]. Komplex se naváže na specifický receptor HpHbR (haptoglobin-hemoglobin receptor) ve flagelární kapse parazita a následně probíhá endocytóza a okyselení vzniklého váčku. To vede k uvolnění hemu z receptoru. Pomocí transportních proteinů je hem uvolněn do cytosolu [32]. Receptor je transportován zpět do flagelární kapsy. Schéma procesu je zobrazeno na obrázku 5, str. 18.

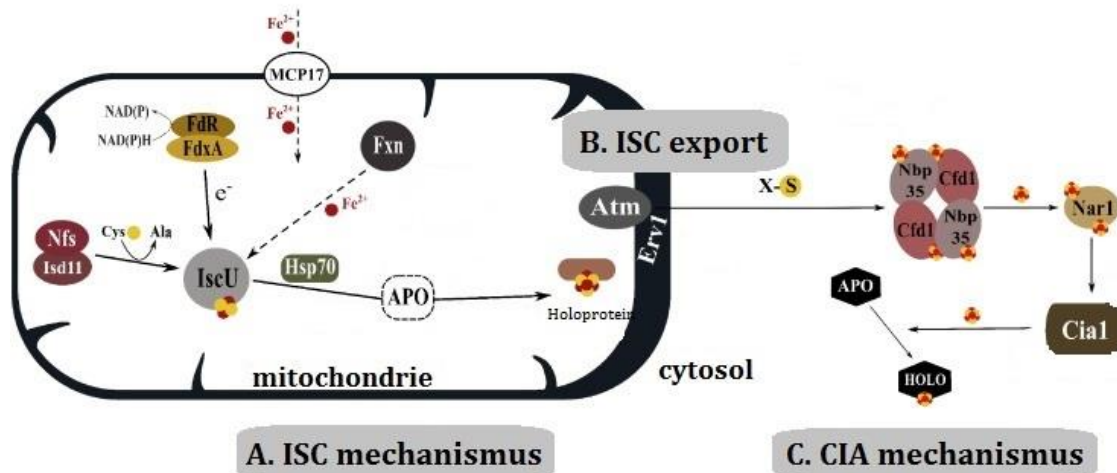
V hmyzím přenašeči se haptoglobin-hemoglobinový komplex nevyskytuje, proto v této fázi receptor HpHbR trypanosoma postrádá [38]. Příjem volného hemu je zprostředkován specifickým membránovým transportérem *TbHrg* (hemový transportér *T.brucei* „*T. brucei* heme-responsive gene protein“) [32]. Schéma procesu je zobrazeno na obrázku 6, str. 19.

1.3.3 Železosírná centra

Železosírná centra jsou eukaryotickými organismy využívána jako kofaktory enzymů [39], například sukcinátdehydrogenasy nebo fumarasy. Biosyntéza těchto proteinů je v *T. brucei* závislá na homeostázi iontů železa a probíhá *de novo* v několika fázích. Asimilované ionty železa jsou transportovány do mitochondrie proteinem Mcp17 [40], kde probíhá mitochondriální dráha skládání železosírných center („mitochondrial iron-sulfur cluster assembly“, ISC). Tento mechanismus je součástí biosyntézy všech proteinů s železosírným kofaktorem, nacházejících se v mitochondrii [32].

Proces je centralizován na enzym skládající železosírná centra (IscU, „Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme“), na který je ferredoxinem A (FdxA) dodán z NADH elektron. Cystein desulfurasou (komplex Nfs1-Isd11) je desulfurací cysteinu dodán ion síry. Vzniklý železosírný komplex je následně inkorporován chaperonem (Hsp70, „heat shock protein“) a dalšími podpůrnými proteiny do specifických mitochondriálních apoproteinů [32].

Tvorba železosírných center v cytosolu je závislá na mitochondriální ISC dráze, na který navazuje ISC exportní mechanismus (ISC export machinery) a cytosolická dráha skládání proteinů obsahujících železosírné centrum (CIA, „cytosolic iron-sulfur cluster assembly“). Tato dráha je potřebná pro maturaci proteinů obsahujících železosírná centra přítomných v cytosolu a buněčném jádře [40]. Doposud neznámá látka obsahující síru je transportována z mitochondrie do cytosolu. Jediným známým pojítkem je transportér Atm. V cytosolu je z přítomných iontů železa pomocí molekulárního lešení (Nbp35-Cfd1) sestaveno železosírné centrum, které je pomocí přenašeče železosírných center (Nar1 a Cia1) inkorporováno do apoproteinů [32]. Je zajímavé, že i když se v cytosolu nachází všechny potřebné složky železosírných proteinů, jejich syntéza je podmíněna předchozím ISC mechanismem a ISC exportem. Celý proces je zobrazen na obrázku 7, str. 22.



Obrázek 7, schéma syntézy železosírných center u *T. brucei*. A. ISC mechanismus: železnaté ionty jsou importovány domnělým proteinem Mcp17 do vnitřního prostoru mitochondrie, kde jsou za pomoci několika proteinů inkorporovány do apoenzymu (na obrázku demonstrováno vznikem Holo akonitasy).

B. ISC export: je závislý na transportéru Atm, transportující neznámý substrát obsahující síru do cytosolu. C. CIA mechanismus: dochází k maturaci cytosolických a jaderných proteinů. Přerušované šipky představují domnělé souvislosti. FdR, NADH ferredoxin reduktáza; FdxA, ferredoxin A; Fxn, frataxin; Hsp70, chaperon „heat shock protein“; IscU, enzym skládající železosírná centra „iron-sulfur cluster assembly enzyme“; Nar1 a Cia1, přenašeče železosírných center; komplex Nfs1-Isd11, cystein desulfurasa; Nbp35-Cfd1, molekulární lešení. Převzato a upraveno z [32].

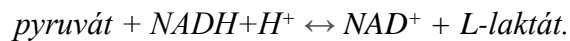
1.4 Enzymy

1.4.1 Pyruvátkinasa EC 2.7.1.40

Pyruvátkinasa patří do skupiny transferas. Nachází se v cytosolu, kde katalyzuje reakci glykolýzy (viz obrázek 3, str. 16):



Pyruvátkinasu lze stanovit měřením spřažené reakce, kdy je pyruvát dále spotřebováván enzymem laktátdehydrogenasou (EC 1.1.1.27) za úbytku $\text{NADH} + \text{H}^+$, dle reakce:



Ani jeden z těchto enzymů neobsahuje železosírné centrum jako kofaktor.

1.4.2 Threonindehydrogenasa EC 1.1.1.103

Threonindehydrogenasa patří do skupiny oxidoreduktas. Nachází se v mitochondrii, kde katalyzuje reakci metabolismu mitochondrie (viz obrázek 4 str. 17):



Tento enzym neobsahuje železosírné centrum jako kofaktor

1.4.3 Fumarasa EC 4.2.1.2

Fumarasa je enzym patřící do skupiny synthas. Většina organismů exprimují dvě isoformy tohoto enzymu - mitochondriální a cytosolickou. Existují dvě třídy fumaras –fumarasy I. třídy (fumC), které jsou termolabilní, citlivé na kyslík a obsahují železosírné centrum jako kofaktor, a fumarasy II. třídy, které jsou termostabilní a nezávislé na iontech železa. Obě fumarasy *T. brucei* spadají do I. třídy a obsahují železosírné centrum (Fe_4S_4) jako kofaktor [41].

Fumarasa katalyzuje v cytosolu i mitochondrii reakci (viz obrázek 3 str. 16 a obrázek 4 str. 17):



1.4.4 Akonitasa EC 4.2.1.3

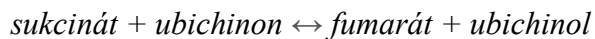
Akonitasa je enzym patřící do skupiny synthas. V mitochondrii se účastní Krebsova cyklu katalýzou reakce (viz obrázek 4 str. 17):



V cytosolu má akonitasa regulační funkci. V případě nedostatku iontů železa ztrácí železosírný kofaktor. Takto vzniklý apoprotein je označován jako protein IRP-1 (iron regulatory protein 1) a vazbou na úseky mRNA reguluje transkripci úseků kódující proteiny regulující homeostázi iontů železa v buňce. Bez kofaktoru postrádá funkci enzymové katalýzy [42]. Kofaktorem tohoto enzymu je železosírné centrum (Fe_4S_4).

1.4.5 Sukcinátdehydrogenasa EC 1.3.5.1

Sukcinátdehydrogenasa patří do skupiny oxidoreduktas. Nachází se zakotvena ve vnitřní mitochondriální membráně, kde je součástí Krebsova cyklu a dýchacího řetězce jako komplex II. Katalyzuje reakci (viz obrázek 4 str. 17):



Kofaktorem tohoto enzymu jsou tři železosírná centra (Fe_2S_2), (Fe_3S_4) a (Fe_4S_4), FAD a cytochrom C.

2. Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shromáždit poznatky o příjmu a utilizaci iontů železa u parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*. Účelem experimentální části byla lokalizace proteinu Mcp17 a testování vlivu snížení exprese genu *mcp17* na aktivity enzymů závislých na přítomnosti iontů železa v mitochondrii a cytosolu hmyzí formy *T. brucei*.

3. Materiál a metody

3.1 Buněčný materiál

Mgr. Jan Mach, Ph.D. 16. 10. 2014 poskytl procyklické buňky hmyzí formy *T. b. brucei*, kmen 29-13 [43] s plasmidem p2t7-177 [44] umožňující potlačení exprese genu *mcp17* RNA interferencí, a stejný kmen s plasmidem pT7-3V5 [45] exprimující protein Mcp17 s V5 značkou, která byla použita na buněčnou lokalizaci.

3.2 Materiál a chemikálie

GE Healthcare Life Sciences, USA

SDM-CGGGPPTA (suchý koncentrát pro přípravu média SDM-79)

Gold biotechnology, USA

Neomycin

Lach:ner, CZ

chlorid draselný

Life Technologies, USA

fetální bovinní sérum (FBS), MitoTracker red CMXRos

Penta, CZ

sacharosa, hydroxid draselný

Sigma, USA

glukosa, glycerol, tetracyklin, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonová (HEPES), Phleomycin, Hygromycin B, Kit pro měření proteinů BCA (Bicinchronic acid kit for protein determination), digitonin, triton X-100, Nikotinamidadenindinukleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$ i NAD^+), adenosindifosfát (ADP), laktátdehydrogenasa EC 1.1.1.27, fosfoenolpyruvát (PEP), hydrogenuhličitan sodný, octan sodný, kyselina L-glutamová, L-glutamin, L-prolin, L-threonin, pyruvát sodný, penicillin, malát, DL-izocitrát, kys. aminocapronová, dodecyl maltosid, Hank's balanced salt solution (HBSS), chlorid hořečnatý, 2,6-Dichlorofenolindofenol (DCPIP), sukcinát sodný, ubichinon, siřičitan hořečnatý, triethanolamin, Tris-HCl pufr, tween 20, fosfátový pufr (PBS), dihydrogenfosforečnan draselný, hemin, triethanolamin, síran hořečnatý

Thermo Fisher scientific, USA

primární protilátka - primární králičí protilátka proti V5 značce

sekundární protilátka – GREEN RABBIT 488nm, oslí protilátka konjugovaná s Alexa fluor 488 proti králičímu imunoglobulinu G

Vector Laboratories, USA

vectashield s DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol)

Média a roztoky

Růstové médium SDM-79 – 2,2% SDM-CGGGPPTA; 2,4 mM hydrogenuhličitan sodný; 1 mM acetát sodný; 0,15 mM kys. L-glutamová; 3,5 mM L-glutamin; 5,5 mM L-prolin; 3,5 mM L-threonin; 1 mM pyruvát sodný; 16 mM glukosa; 8 mM hemin; 100 000 U/l Penicillin; 10% FBS

SHE – 250 mM sacharosa, 25 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4

pufr PYK – 0,1 M Triethanolamin; 5 mM síran hořečnatý; 50 mM chlorid draselný; pH 7,6

pufr TDH – 0,2 M Tris-HCl pufr; 0,25 M chlorid draselný; pH 8,6

pufr FUM – 20 mM Tris-HCl pufr; pH 7,5

pufr AKO – 0,09 M Tris-HCl pufr; pH 7,5

pufr PFO – 25 mM dihydrogenfosforečnan draselný; 5 mM chlorid hořečnatý; 20 mM sukcinát sodný; pH 7,2

Blokovací roztok – 0,25% BSA 0,25% želatina 0,05% tween v PBS.

3.3 Přístroje

analytické váhy – Mettler-Toledo 204

box s laminárním prouděním vzduchu – Airstream Tesco Class II BSC

centrifugy - Hettich universal 320 R centrifuge, Labnet prism microcentrifuge

inkubátor - Biometra 2548

kyvety – křemenná Quartz 0,5 ml, šířka 1 cm

mikroskop – fluorescenční mikroskop Olympus IX81 s digitální kamerou Hamamatsu Orca-G

počítač buněk - Beckman-Coulter Z2 Coulter Counter

spektrofotometr – Shimadzu UV-2600 UV-VIS spectrophotometer

vodní lázeň – POlab Grant

programy – *MS excel 2013* ke zpracování dat, *UV probe* ke spektrofotometrickému měření, *cell^R imaging* k digitálnímu záznamu mikroskopie, *ImageJ* ke zpracování fotografií

3.4 Metody

3.4.1 Kultivace *T. brucei*

Buňky byly dlouhodobě uchovávány v tekutém dusíku v 10% glycerolu v objemu 1 ml. Po rozmrazení byla kultura naředěna v 5 ml růstového média ve sterilních podmínkách a stočena při 1300 g, 5 min, 4 °C. Pelet buněk byl resuspendován v 5 ml čerstvého růstového média s příslušnými antibiotiky. Po 24 hodinách byly buňky překontrolovány a přeočkovány.

Ke kultivaci *T. brucei* bylo využito médium SDM-79 [46] (úprava Brusel podle Paula Michelse [47]) s příslušnými selekčními antibiotiky a dostatkem glukosy, aby v procyklické kultuře probíhala glykolýza a zároveň byla aktivní i mitochondrie. Během přípravy na pokus byla kultura udržována při 27 °C v 5 ml v kultivačních nádobách v exponenciální fázi růstu, což odpovídá koncentraci $1 \cdot 10^6$ až $2 \cdot 10^7$ buněk/ml. Každých 72 h byla kultura 10x zředěna.

V této práci byly použity dvě buněčné linie *T. brucei*. Obě vycházejí z rodičovské linie označené 29-13, která exprimuje T7 polymerázu a tetracyklinový represor. Geny jsou v genomu udržovány antibiotiky neomycinem a hygromycinem.

Linie s potlačenou expresí genu *mcp17* pomocí RNA interference měla transfekovaný plasmid p2T7-177 s phleomycinovou resistencí a vloženým genem *mcp17*. RNA interference pomocí tohoto plasmidu je indukovatelná přidáním tetracyklinu, čímž dojde k vyvázání tetracyklinového represoru z jeho vazebného místa na promotoru genu a ke snížení nebo úplné zastavení exprese proteinu Mcp17.

Linie exprimující Mcp17 s V5 značkou, která byla použita na buněčnou lokalizaci, obsahuje plasmid pT7-3V5 s puromycinovou resistencí a také indukovatelnou expresí pomocí tetracyklinu. Použité koncentrace antibiotik jsou shrnuty v tabulce 1, str. 31.

Tabulka 1, finální koncentrace antibiotik přidané ke kultuře *T. brucei* s plasmidy p2T7-177 a pT7-3V5.

Antibiotikum	Finální koncentrace (µg/ml)
Hygromycin	50,0
Neomycin	15,0
Phleomycin	2,5
Puromycin	2,5
Tetracyklin	1,0

Tetracyklin byl použit pouze na indukci RNA interference genu *mcp17*, případně expresi značeného proteinu Mcp17.

3.4.2 Růstová křivka

Během kultivace byla kultura udržována v exponenciální fázi růstu, což odpovídá koncentraci $1 \cdot 10^6$ až $2 \cdot 10^7$ buněk/ml. Každých 24 h byla kultura zředěna na $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Ke stanovení časového bodu, kdy dojde k ovlivnění fenotypu kvůli dostatečnému snížení proteinu Mcp17, bylo nutné zpracovat růstovou křivku kultury s indukovanou RNA interferencí genu *mcp17* v porovnání s neindukovanou kulturou. Růstová křivka byla započata s koncentrací $1 \cdot 10^6$ buněk na ml kultivovaných v médiu SDM-79 v inkubátoru při 27 °C. V přibližně 24 hodinových intervalech byl na počítači buněk změřen aktuální počet buněk ve 20 µl vzorku. Zpětně byl vypočítán aktuální počet buněk v celé kultuře a sestrojena růstová křivka.

3.4.3 Lokalizace proteinu Mcp17

Lokalizace proteinu Mcp17 byla provedena mikroskopickou analýzou overexprimovaného značeného proteinu v buňce *T. brucei*. Protein Mcp17 byl vizualizován králičí monoklonální primární protilátkou proti V5 značce s navázanou oslí, anti-králičí protilátkou, konjugovanou s Alexa fluor 488. Mitochondrie byla označena fluorescenční sondou MitoTracker red CMXRos. DNA byla označena DAPI obsaženém v zalévacím roztoku Vectashield.

K lokalizaci proteinu byla využita kultura *T. brucei* 29-13 s plasmidem pT7-3V5 obsahujícím resistenci vůči puromycinu a kompletní gen *mcp17* s V5 značkou. Dva dny po indukci kultury v exponenciální fázi růstu (cca $1 \cdot 10^7$ buněk/ml) bylo 500 μ l kultury odebráno a inkubováno s 0,5 μ l mitotrackeru Red CMXRos v otevřené mikrozkuhavce 10 minut ve 27 °C. Následně byla kultura centrifugována (1500 g, 5 min, 24 °C), pelet resuspendován v 500 μ l média SDM-79 a inkubován v otevřené mikrozkuhavce 20 min ve 27 °C. Směs byla centrifugována (1500 g, 5 min, 24 °C), pelet promyt 500 μ l v PBS (1500 g, 5 min, 24 °C) a resuspendován v 300 μ l PBS.

Takto připravené buňky byly nanášeny na mikroskopické sklíčko a ponechány zaschnout při 27 °C. Po zaschnutí bylo sklíčko ponořeno na 5 minut do metanolu vychlazeného na -20 °C a poté na 5 minut do acetonu při -20 °C. Podložní sklíčko bylo převrstvené blokovacím roztokem a umístěno do vlhké komůrky do tmy, aby nedošlo k vyschnutí preparátu a vysvícení mitotrackeru. Následovala inkubace 1 h při pokojové teplotě. Poté byl blokovací roztok opatrně odsát, a sklíčko bylo převrstveno primární králičí protilátkou proti V5 značce, smíchanou s blokovacím roztokem v poměru 1:1000 a inkubováno 1 h při pokojové teplotě ve vlhké komůrce.

Podložní sklíčko bylo třikrát převrstveno 500 μ l PBS na pět minut, poté byl roztok odsát. Podložní sklíčko bylo následně převrstveno sekundární oslí protilátkou proti králičímu imunoglobulinu G smíchanou s blokovacím roztokem v poměru 1:1000 a inkubováno 1 h při pokojové teplotě. Následně bylo třikrát převrstveno 500 μ l PBS na pět minut, poté byl roztok odsát. Preparát byl po nanášení montovacího roztoku vectashield s DAPI překryt krycím sklíčkem a uložen do 4 °C nebo rovnou použit na mikroskopii. Preparáty byly vizualizovány na mikroskopu Olympus IX8 a vizualizovány pomocí programu *ImageJ*.

3.4.4 Digitoninová frakcionace buněk

Digitonin je neionizující detergent, který tvoří po navázání na cholesterol póry v buněčných membránách. V závislosti na koncentraci permeabilizuje nejprve cytoplasmatickou membránu, ve vyšších koncentracích následně i mitochondriální nebo glykosomální membránu. Vzniklé póry umožní průchod proteinů až do velikosti 200 kDa [48].

Cílem frakcionace bylo připravit zvlášť cytosolickou a mitochondriemi obohacenou buněčnou frakci, která by obsahovala volné enzymy přístupné substrátu. Připraveny byly zvlášť frakce z kultury s neindukovanou a z kultury s indukovanou RNA interferencí genu *mcp17*.

3.4.4.1 Příprava buněk na frakcionaci

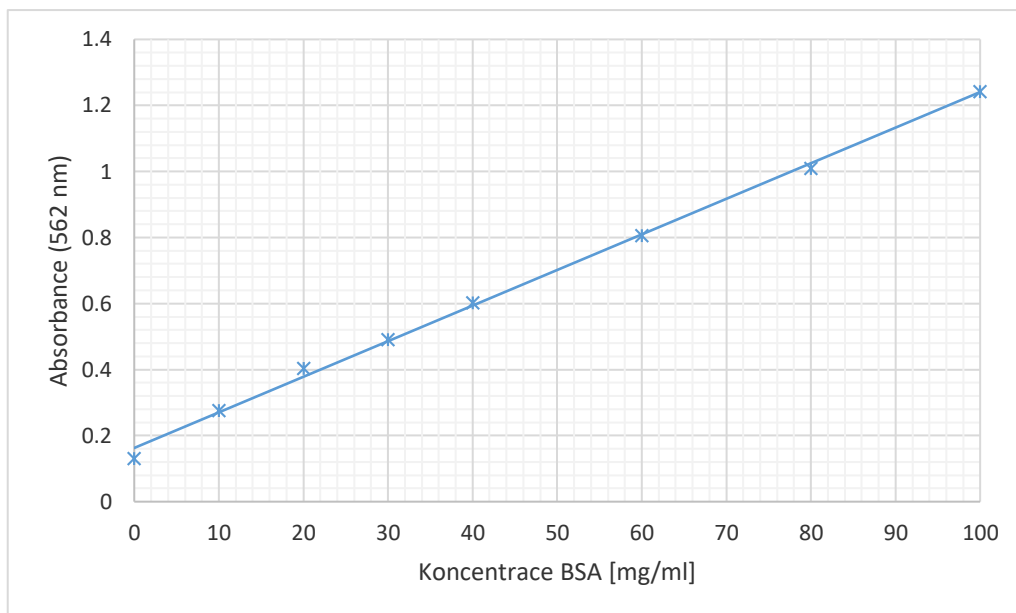
Přibližně 50 ml kultury bylo centrifugováno v pozdní exponenciální fázi růstu, 1000 g, 15 min při 4 °C a roztok dekantován. Kultura byla dvakrát promyta 20 ml ledového SHE (centrifugace 1000 g, 15 min, 4 °C). Takto vzniklý pelet buněk byl resuspendován v 300 µl ledového SHE a uchován na ledu pro další použití.

3.4.4.2 Určení množství proteinů

K výpočtu množství digitoninu použitého na frakcionaci muselo být stanoveno množství proteinů ve vzorku. Proteiny byly stanoveny s využitím kitu pro měření proteinů metodou BCA (bicinchoninic acid). Byla využita kalibrační řada roztoku bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentracích 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 a 100 mg/ml.

Malá část kultury byla 10× naředěna destilovanou vodou a 10 µl takto zředěné kultury bylo převedeno do kyvety a doplněno do 100 µl destilovanou vodou.

Ke kalibrační řadě i k měřeným vzorkům byly přidány 2 ml předehřátého měřícího roztoku. Směs byla 15 minut inkubována při 60 °C a poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při 562 nm. Na základě porovnání absorbance vzorku s kalibrační křivkou byla určena koncentrace proteinů ve vzorku. Typická kalibrační křivka je ukázána na obrázku 8, str.34.



Obrázek 8, typická kalibrační křivka při stanovení množství proteinů ve vzorku metodou BCA

3.4.4.3 Preparativní frakcionace

Z určené koncentrace proteinů byl vypočítán objem kultury obsahující 1 mg buněk a tento objem byl smíchán v poměru 1:0,1 (hm.) digitoninu (použitá koncentrace dle ústního sdělení Mgr. Jana Macha, Ph.D. 23.10.2014). Bylo přidáno množství roztoku HBSS (Hank's balanced salt solution) do celkového objemu 800 μ l.

Směs byla inkubována 4 minuty při pokojové teplotě a následně stočena (18000 g, 2 min, 4 °C). Supernatant obsahující cytosolickou frakci byl převeden do mikrozkušavky a umístěn na led k využití na měření aktivit enzymů.

Pelet obsahující mitochondriální frakci byl promyt 1 ml HBSS (18000 g, 2 min, 4 °C), resuspendován v 800 μ l HBSS a umístěn na led k využití na měření aktivit enzymů.

Vzorek pro měření SDH (sukcinátdehydrogenasy) byl připraven z mitochondriální frakce. Zvolený objem byl centrifugován při 18000 g, 2 min, 4 °C a resuspendován ve stejném objemu roztoku HBSS s 0,5 M kyselinou aminocapronovou a 2% dodecyl maltosidem. Směs byla 15 min inkubována na ledu a poté centrifugována na 18000 g, 5 min, 4 °C. Supernatant byl ihned použit k měření aktivit enzymů. Malé vzorky mitochondriální frakce a cytosolické frakce byly odebrány pro pozdější stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA kitu.

3.4.5 Měření aktivit enzymů

Postupy měření aktivit enzymů byly získané ze zdroje [47] a měření sukcinátdehydrogenasy dle ústního sdělení RNDr. Zdeňka Věrněra, Ph.D. (23.10.2014).

Pro kontrolu postupu byly využity enzymy pyruvátkinasa (cytosolický enzym) a threonindehydrogenasa (mitochondriální enzym), které neobsahují jako kofaktor železosírná centra a jejich aktivita by tedy měla být srovnatelná v kultuře s neindukovanou i indukovanou RNA interferencí genu *mcp17*.

Během měření byly všechny složky kromě reakčního pufru uchovávány na ledu. Měřicí pufr a spektrofotometr byly temperovány na 24 °C. Využita byla křemenná kyveta o šířce 1 cm a objemu 0,5 ml.

Triton X-100 byl přidán při měření mitochondriálních proteinů k permeabilizaci membrány a uvolnění proteinů do roztoku. Výsledná koncentrace Tritonu X-100 v roztoku byla vždy 0,1%.

Před měřením aktivit mitochondriálních enzymů bylo nejprve změřeno pozadí aktivity, pomocí kontrolního enzymu z matrix mitochondrie threonindehydrogenasy. Intaktní mitochondriální frakce (bez přídavku Tritonu X-100) byla smíchána se složkami reakce bez spouštěcího substrátu. Byla sledována změna absorbance za čas a po jejím ustálení byl přidán spouštěcí substrát L-threonin. Pokud ani poté nebyla zaznamenána významná změna absorbance za čas způsobená enzymem katalyzovanou reakcí, znamená to, že mitochondrie je intaktní i pro malé molekuly. Následně byla membrána mitochondrie permeabilizována Tritonem X-100 a tím bylo umožněno substrátu dostat se k enzymu a reakce začala probíhat. Výsledná latence je podíl rychlosti reakce před permeabilizací mitochondriální membrány a po ní.

3.4.5.1 Stanovení aktivity pyruvátkinasy EC 2.7.1.40

Byl měřen úbytek $\text{NADH}+\text{H}^+$, tedy změna absorbance při 340 nm. Molární extinkční koeficient $\text{NADH}+\text{H}^+$ při této vlnové délce je $6,22 \text{ mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Složení reakční směsi je shrnuto v tabulce 2.

Tabulka 2, složení reakční směsi pyruvátkinasy.

Složka	Objem [μl]
PYK pufr	416
15 mM $\text{NADH}+\text{H}^+$	25
0,1 M ADP	10
LDH v EDB	5
Buněčný vzorek	30
0,1 M fosfoenolpyruvát	14
Celkový objem	500

Aktivita enzymu v cytosolické frakci byla měřena před a po přidání fosfoenolpyruvátu.

Aktivita enzymu v mitochondriální frakci byla měřena před a po přidání fosfoenolpyruvátu a po přidání Tritonu X-100.

3.4.5.2 Stanovení aktivity threonindehydrogenasy EC 1.1.1.103

Byl měřen přírůstek $\text{NADH}+\text{H}^+$, tedy změna absorbance při 340 nm. Molární extinkční koeficient $\text{NADH}+\text{H}^+$ při této vlnové délce je $6,22 \text{ mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$. Složení reakční směsi je shrnuto v tabulce 3.

Tabulka 3. složení reakční směsi threonindehydrogenasy.

Složka	Objem [μl]
TDH pufr	360
0,6 M L-threonin	100
Buněčný vzorek	30
0,125 M NAD^+	10
Celkový objem	500

Aktivita enzymu v cytosolické frakci byla měřena před a po přidání NAD^+ .

Aktivita enzymu v mitochondriální frakci byla měřena před a po přidání NAD^+ a po přidání Tritonu X-100.

3.4.5.3 Stanovení aktivity fumarasy EC 4.2.1.2

Byl měřen přírůstek fumarátu, tedy změna absorbance při 240 nm. Molární extinkční koeficient fumarátu při této vlnové délce je $2,44 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Složení reakční směsi je shrnuto v tabulce 4.

Tabulka 4. složení reakční směsi fumarasy.

Složka	Objem [μl]
FUM pufr	460
Buněčný vzorek	30
1 M malát	10
Celkový objem	500

Aktivita enzymu v cytosolické frakci byla měřena před a po přidání malátu.

Aktivita enzymu v mitochondriální frakci byla měřena před a po přidání malátu a po přidání Tritonu X-100.

3.4.5.4 Stanovení aktivity akonitasy EC 4.2.1.3

Byl měřen přírůstek cis-akonitátu, tedy změna absorbance při 240 nm. Molární extinkční koeficient cis-akonitátu při této vlnové délce je $3,60 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Složení reakční směsi je shrnuto v tabulce 5.

Tabulka 5. složení reakční směsi akonitasy.

Složka	Objem [μl]
AKO pufr	440
Buněčný vzorek	40
0,5 M DL- izocitrát	20
Celkový objem	500

Aktivita enzymu v cytosolické frakci byla měřena před a po přidání DL-izocitrátu.

Aktivita enzymu v mitochondriální frakci byla měřena před a po přidání DL-izocitrátu a po přidání Tritonu X-100.

3.4.5.5 Stanovení aktivity sukcinátdehydrogenasy EC 1.3.5.1

Během reakce je DCPIP redukován, což vede k jeho odbarvení, měří se tedy změna absorbance při 240 nm. Molární extinkční koeficient DCPIP při této vlnové délce je $21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Složení reakční směsi je shrnuto v tabulce 6.

Tabulka 6. složení reakční směsi sukcinátdehydrogenasy.

Složka	Objem [μl]
SDH pufr	434
10x zředěné DCPIP	8
1M MgCl_2	3
0,5 M Sukcinát sodný	20
Buněčný vzorek	30
Ubichinon	5
Celkový objem	500

Aktivita enzymů byla měřena před a po přidání ubichinonu.

3.4.6 Zpracování výsledků

Změna absorbance za čas po přidání spouštěcího substrátu enzymem katalyzované reakce byla porovnána se změnou absorbance za čas před přidáním této látky a jako výsledek byl použit rozdíl těchto hodnot. Dále byla vypočítána specifická aktivita vztažená na množství proteinů. Tyto hodnoty byly využity k porovnání aktivity enzymů kultur s neindukovanou a indukovanou RNA interferencí genu *mcp17*.

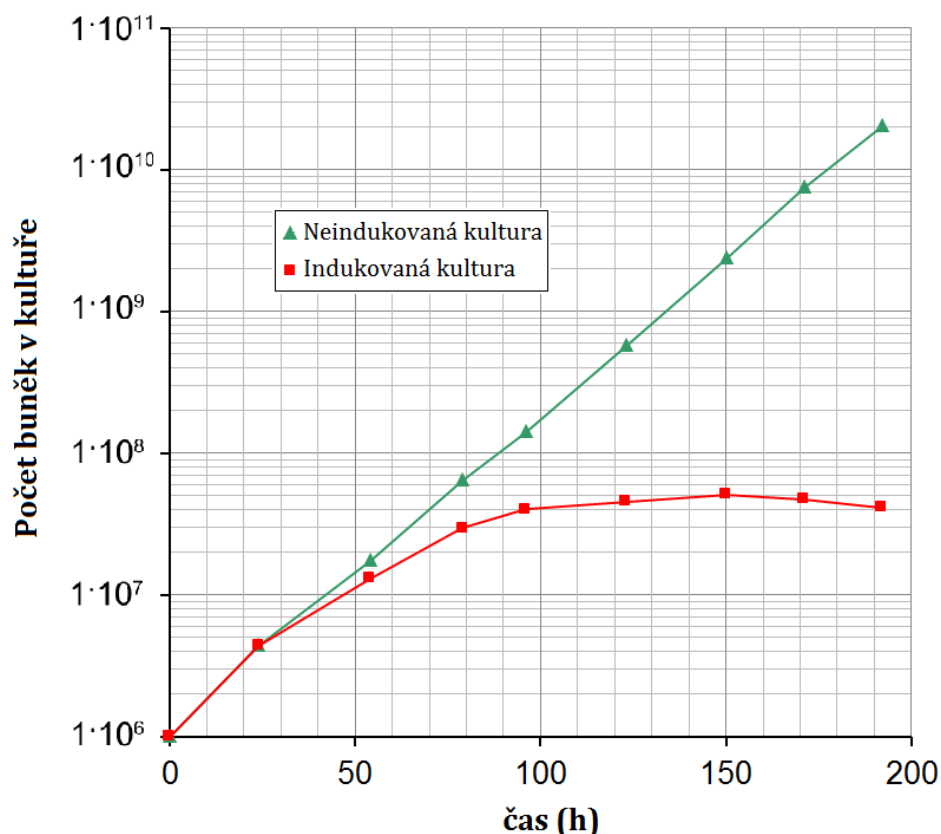
Ke zpracování výsledků byly použity statistické testy. Grubbsův test byl použit k určení odlehlých měření na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Tyto odlehlé hodnoty byly vyřazeny. K porovnání významnosti rozdílu měření enzymových aktivit obou kultur byl použit t-test na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

4. Výsledky

4.1 Růstová křivka

K sestrojení růstové křivky byla využita kultura *T. brucei* 29-13 s plasmidem p2t7-177 s indukovatelným tetracyklinovým receptorem, což umožňovalo snížení, nebo úplnému zastavení exprese proteinu Mcp17.

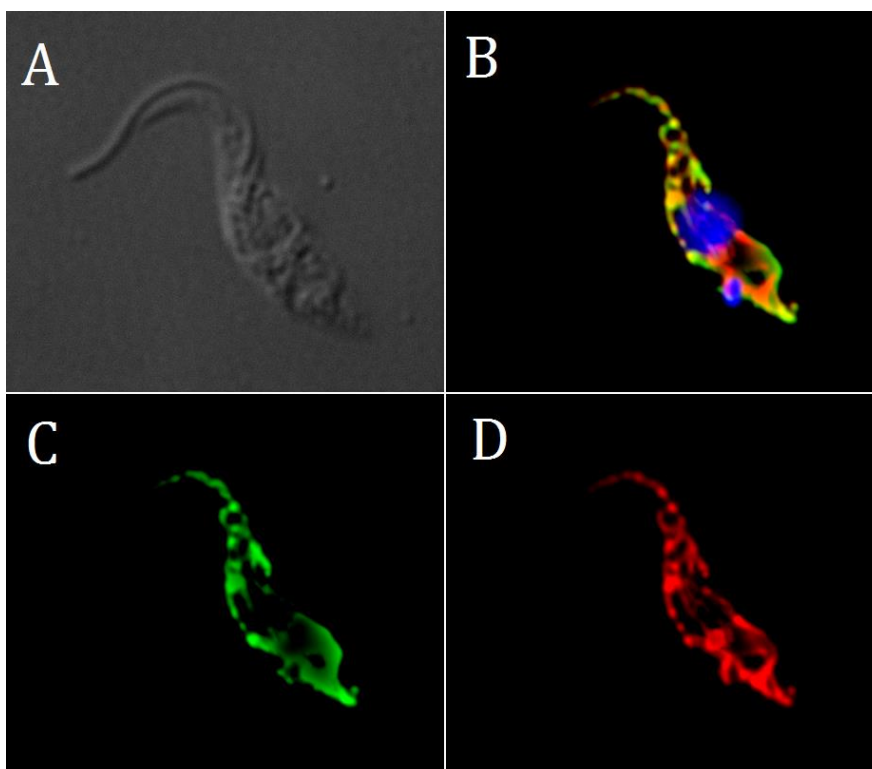
Sestrojená růstová křivka (obrázek 9) prokázala rozdílný nárůst kultury s neindukovanou a indukovanou RNA interferencí, kdy kultura s indukovanou RNA interferencí zhruba po 48 h přecházela do stacionární fáze růstu.



Obrázek 9, růstová křivka *T. brucei* s plasmidem p2t7-177 s indukovatelným tetracyklinovým receptorem, což umožňovalo snížení, nebo úplnému zastavení exprese genu *mcp17*. Bez indukce (zelený trojúhelník - „neindukovaná kultura“) a s indukovaným snížením exprese genu *mcp17* (červený čtverec - „indukovaná kultura“).

4.2 Lokalizace proteinu Mcp17

K lokalizaci proteinu Mcp17 byla využita kultura *T. brucei* 29-13 s plasmidem pT7-3V5 exprimující protein Mcp17 s V5 značkou. Protein Mcp17 byl značen králičí monoklonální primární protilátkou proti V5 značce s navázanou oslí, anti-králičí protilátkou, konjugovanou s Alexa fluor 488. Mitochondrie byly značeny mitotrackerem Red CMXRos. DNA byla označena DAPI obsaženém v zalévacím roztoku Vectashield. Kultura byla následně na mikroskopu zobrazena pomocí programu *ImageJ*. Mitochondriální lokalizace proteinu Mcp17 v buňce *T. brucei* byla potvrzena překryvem signálu Mcp17 s mitochondriálním signálem, viz obrázek 10.



Obrázek 10, lokalizace proteinu Mcp17. Jednotlivé obrázky zobrazují buňku *T. brucei*: A, diferenciální kontrast; B: modře DNA (nukleus a kinetoplast), zeleně protein Mcp17, červeně mitochondrie; C: zeleně protein Mcp17; D: červeně mitochondrie. K lokalizaci proteinu Mcp17 byla využita kultura *T. brucei* 29-13 s plasmidem pT7-3V5, Primární králičí protilátka proti V5 značce, sekundární protilátka GREEN RABBIT 488nm, oslí protilátka konjugovaná s Alexa fluor 488 proti králičímu imunoglobulinu G. Mitochondrie byly značeny mitotrackerem Red CMXRos. DNA byla označena DAPI obsaženém v zalévacím roztoku Vectashield. Obraz byl zpracován pomocí programu *ImageJ*.

4.3 Aktivita enzymů

Pro kontrolu připravených enzymových reakcí byly využity enzymy pyruvátkinasa a threonindehydrogenasa, které neobsahují kofaktor s ionty železa. Jejich aktivita by neměla být ovlivněna expresí genu *mcp17* a tedy by měla být srovnatelná v kultuře s neindukovanou i indukovanou RNA interferencí tohoto genu. Jak je patrné i z grafů aktivit těchto enzymů (obrázek 11, str. 44), v obou kulturách byla jejich aktivita srovnatelná. Statistický t-test označil rozdíl průměrů těchto aktivit v kultuře s neindukovanou i indukovanou RNA interferencí v obou případech za statisticky nevýznamný. Z tohoto lze tedy usoudit, že genetickou modifikací nedošlo k ovlivnění enzymů bez kofaktorů železa.

Ke zjištění vlivu proteinu *Mcp17* na aktivitu enzymů s železosírným kofaktorem byly kultivovány kultury s neindukovanou a s indukovanou RNA interferencí *T. brucei*, dle kapitoly 3.4.1. Obě kultury byly frakcionovány (kapitola 3.4.4), a v lyzátech buněčných kompartmentů byla změřena aktivita vybraných enzymů (kapitola 3.4.5). Údaje byly zpracovány dle kapitoly 3.4.6. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

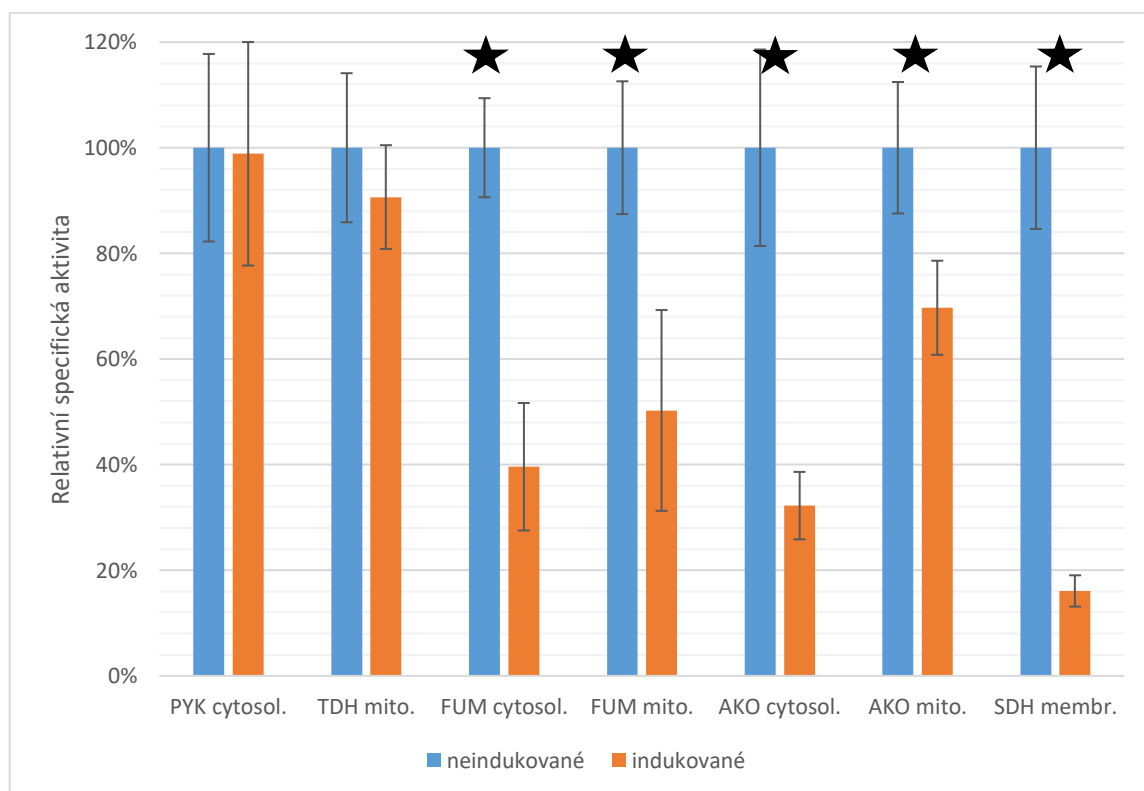
Tabulka 7, specifické aktivity enzymů

Enzym	Specifická aktivita [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$] $\cdot 10^{-3}$ ($\pm\text{SD}$; n)		Relativní aktivita [%] ($\pm\text{SD}$)	
	neindukované	indukované	neindukované	indukované
PYK cytosol	125 (± 35 ; 9)	133 (± 52 ; 10)	100 (± 28)	106 (± 42)
TDH mito.	145 (± 24 ; 6)	175 (± 74 ; 8)	100 (± 16)	120 (± 51)
* FUM cytosol	518 (± 121 ; 11)	200 (± 80 ; 11)	100 (± 23)	39 (± 15)
* FUM mito.	20 (± 6 ; 11)	10 (± 4 ; 10)	100 (± 32)	51 (± 19)
* AKO cytosol	20 (± 4 ; 11)	6 (± 1 ; 10)	100 (± 19)	32 (± 6)
* AKO mito.	9 (± 1 ; 9)	7 (± 1 ; 8)	100 (± 12)	77 (± 15)
* SDH	58 (± 18 ; 9)	16 (± 11 ; 10)	100 (± 31)	28 (± 19)

Naměřené průměrné hodnoty specifických enzymových aktivit *T. brucei*, vztažených na hmotnost. Bez indukce („neindukované“) a s indukovaným snížením exprese genu *mcp17* („indukované“).

Hvězdičkou jsou označena měření se statisticky významným rozdílem aktivit neindukované a indukované kultury. PYK, pyruvátkinasa; TDH, threonindehydrogenasa; FUM, fumarasa; AKO, akonitasa; SDH, sukcinátdehydrogenasa; SD, směrodatná odchylka; n, počet měření.

Graf na obrázku 11 zobrazuje relativní hodnoty naměřených absorbancí vybraných proteinů v kultuře s neindukovanou a indukovanou RNA interferencí genu *mcp17*. Zatímco aktivity pyruvátkinasy a threonindehydrogenasy se v jednotlivých kulturách neliší, u kultury s indukovanou RNA interferencí je zaznamenáno přibližně 50% snížení aktivity cytosolické i mitochondriální fumarasy. V této kultuře se také snížila aktivita cytosolické akonitasy přibližně o 70% a mitochondriální akonitasy přibližně o 30%. Aktivita sukcinátdehydrogenasy se v kultuře s indukovanou RNA interferencí snížila přibližně o 80%.



Obrázek 11. Graf relativních hodnot průměrů aktivit vybraných enzymů *T. brucei* bez indukce („neindukované“) a s indukovaným snížením exprese genu *mcp17* („indukované“). Hvězdičkou jsou označena měření se statisticky významným rozdílem aktivit neindukované a indukované kultury. PYK, pyruvátkinasa; TDH, threonindehydrogenasa; FUM, fumarasa; AKO, akonitasa; SDH sukcinátdehydrogenasa.

5. Diskuse

Ionty železa jsou pro *T. brucei* nezbytné jako kofaktory enzymů. Mechanismus tvorby železosírných center je komplexní proces, zahrnující příjem iontů železa z okolí parazita a jeho následným zpracováním v mitochondrii [32]. Protein Mcp17 patří do rodiny mitochondriálních přenašečů, což je skupina strukturně podobných proteinů, které jsou součástí mitochondriální membrány a jsou uzpůsobeny k přenosu metabolických meziproductů [49].

V této práci bylo potvrzeno, že protein Mcp17 je lokalizován v mitochondrii a že se podílí na správné funkci enzymů obsahujících železosírná centra. Již v dřívější studii bylo naznačeno, že protein Mcp17 je lokalizován v mitochondrii [49]. Tato studie byla provedena overexpresí, proto bylo pro tuto práci rozhodnuto potvrdit výsledek exprese z jiného vektoru a zároveň specifickou protilátkou. Bohužel je protein zřejmě velmi hydrofobní a nenabízí dostatek antigenních oblastí, proto se protilátka nepodařilo vyprodukovat. Ovšem mikroskopické pozorování značeného Mcp17 jasně ukazuje mitochondriální lokalizaci. Těsně před dokončením této práce byl publikován článek, který se lokalizací a funkcí proteinu Mcp17 zabývá u *Leishmanie* a *T. brucei* a dochází ke stejnému závěru [50].

Růstová křivka *T. brucei* (obrázek 9, str. 41) naznačuje, že u kultury s indukovanou sníženou expesí genu *mcp17* nastal dramatický pokles růstu asi po 72 h. Jak naznačují další výsledky, je to pravděpodobně způsobeno nedostatkem iontů železa v matrix mitochondrie a následné nedostatečné tvorbě železosírných center, respektive enzymů s železosírnými centry. Obdobný efekt byl pozorován při snížení exprese některých esenciálních částí dráhy tvorby železosírných center [47] a svědčí o nezbytnosti železosírných center, potažmo enzymů s železosírnými centry.

Měření enzymových aktivit prokázalo, že indukované snížení exprese genu *mcp17* vede ke snížení aktivit enzymů s železosírným kofaktorem v mitochondrii i v cytosolu. Tento výsledek podporuje hypotézu o funkci proteinu Mcp17 jako mitochondriálního přenašeče iontů železa. Po jeho snížení dojde k narušení transportu iontů železa do mitochondrie, kde probíhá mitochondriální dráha skládání železosírných proteinů (ISC) a jejich inkorporace do enzymů. To má pravděpodobně za následek přerušování cytosolické dráhy skládání železosírných proteinů (CIA), která je závislá právě na předchozím mechanismu ISC a ISC exportu do cytosolu [40].

Nejvýznamnější pokles enzymové aktivity u buněk se sníženou expresí genu *mcp17* byl zaznamenán u sukcinátdehydrogenasy. Již dříve bylo prokázáno na myších srdečních buňkách, že narušení mechanismu ISC redukcí exprese mitochondriálního proteinu frataxinu vede ke snížení syntézy proteinů dýchacího řetězce (jehož součástí je sukcinátdehydrogenasa) a ke zvýšení exprese komponentů komplexu pyruvátdehydrogenasy [51]. Je tedy pravděpodobné, že *T. brucei* obdobně utlumí syntézu proteinů dýchacího řetězce a přechází na glykolýzu jako zdroj energie.

Indukce snížení exprese genu *mcp17* nemělo za následek úplné zastavení funkce těchto enzymů a následný úhyn buňky, ale pouze jejich aktivitu snížilo. To lze vysvětlit tím, že mechanismus RNA interference nemusí být absolutně účinný, exprese genu a proteosyntéza tedy mohla probíhat, ale ve značně snížené míře [52]. Je také nutné vzít v potaz, že před indukcí RNA interference neměly buňky omezenou expresi genu *mcp17* a syntéza železosirných kofaktorů probíhala normálně, proto může trvat nějakou dobu, než se jejich nedostatek projeví. Tato doba je ovlivněna přirozenou degradací proteinů, ale i dělením buněk, při kterém se přítomná enzymová výbava dělí mezi obě buňky.

6. Závěr

V této práci bylo prokázáno, že se protein Mcp17 nachází v mitochondrii *T. brucei*. Snížení exprese genu *mcp17* snižuje aktivitu enzymů s železosírným kofaktorem, lokalizovaných v mitochondrii i v cytosolu *T. brucei* a nemá vliv na enzymy bez železosírných center. Tyto výsledky naznačují, že přenos iontů železa do mitochondrie a následná tvorba železosírných center je zprostředkována proteinem Mcp17.

7. Seznam použité literatury

- [1] Uilenberg, G., A Field Guide for the Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis, Food & Agriculture Org., (1998)
- [2] World Health Organization, Control and surveillance of human African trypanosomiasis, World Health Organ. Tech. Rep. Ser., 984, (2013)
- [3] Barrett, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasc, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., The trypanosomiases, Lancet, 362, 1469–1480 (2003)
- [4] Welburn, S.C., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M., Mauldin, I., Sleeping sickness: a tale of two diseases, Trends Parasitol., 17, 19–24 (2001)
- [5] Samanovic, M., Molina-Portela, M.P., Chessler, A.D.C., Burleigh, B.A., Reaper, J., Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates Leishmania infection, PLoS Pathog., 5, (2009)
- [6] Greene, A.S., Hajduk, S.L., Trypanosome Lytic Factor-1 Initiates Oxidation-stimulated Osmotic Lysis of *Trypanosoma brucei brucei*, J. Biol. Chem., 291, 3063–3075 (2016)
- [7] Hager, K.M., Pierce, M.A., Moore, D.R., Tytler, E.M., Esko, J.D., Hajduk, S.L., Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes, J. Cell Biol., 126, 155–167 (1994)
- [8] Raper, J., Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity, Curr. Opin. Microbiol., 4, 402–408 (2001)
- [9] Hager, K.M., Hajduk, S.L., Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL, Nature, 385, 823–826 (1997)
- [10] Connor, R.J., The impact of nagana, Onderstepoort J. Vet. Res., 61, 379–383 (1994)
- [11] Finelle, P., Programme for the control of African animal trypanosomiasis and related development, IAEA, Vienna, Austria (1980)

- [12] Hovel-Miner, G., Mugnier, M., Papavasiliou, F.N., Pinger, J., Schulz, D., A Host-Pathogen Interaction Reduced to First Principles: Antigenic Variation in *T. brucei*, *Results Probl. Cell Differ.*, 57, 23–46 (2015)
- [13] David Barry, J., McCulloch, R., Antigenic variation in trypanosomes: Enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite, *Adv. Parasitol.*, 49, 1–70 (2001)
- [14] García-Salcedo, J.A., Pérez-Morga, D., Gijón, P., Dilbeck, V., Pays, E., Nolan, D.P., A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*, *EMBO J.*, 23, 780–789 (2004)
- [15] Langousis, G., Hill, K.L., Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 505–18 (2014)
- [16] Nikolskaia, O.V., de A Lima, A.P.C., Kim, Y.V., Lonsdale-Eccles, J.D., Fukuma, T., Scharfstein, J., Grab, D.J., Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease, *J. Clin. Invest.*, 116, 2739–2747 (2006)
- [17] Tetley, L., Vickerman, K., Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat, *J. Cell Sci.*, 74, 1–19 (1985)
- [18] Matthews, K.R., The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*, *J. Cell Sci.*, 118, 283–290 (2005)
- [19] Shapiro, T.A., Englund, P.T., The structure and replication of kinetoplast DNA, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 117–143 (1995)
- [20] Shlomai, J., The structure and replication of kinetoplast DNA, *Curr. Mol. Med.*, 4, 623–647 (2004)
- [21] Lecointre, G., Le Guyader, H., Euglenobionta, v knize *The Tree of Life : A Phylogenetic Classification*, Belknap Press of Harvard University Press, str. 128–129. (2006)

- [22] RYLEY, J.F., Studies on the metabolism of the Protozoa. 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of trypanosome, *Biochem. J.*, 62, 215–222 (1956)
- [23] Bakker, B.M., Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R., Westerhoff, H. V., Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei* Can Be Understood in Terms of the Kinetics of the Glycolytic Enzymes, *J. Biol. Chem.*, 272, 3207–3215 (1997)
- [24] Hellemond, J.J. van, Bakker, B.M., Tielens, A.G.M., Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*, *Adv. Microb. Physiol.*, 50, 199–226 (2005)
- [25] Michels, P.A.M., Bringaud, F., Herman, M., Hannaert, V., Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1463–77 (2006)
- [26] van Weelden, S.W.H., van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., Tielens, A.G.M., New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle, *J. Biol. Chem.*, 280, 12451–12460 (2005)
- [27] Kaplan, C.D., Kaplan, J., Iron acquisition and transcriptional regulation, *Chem. Rev.*, 109, 4536–4552 (2009)
- [28] Dunn, L.L., Suryo Rahmanto, Y., Richardson, D.R., Iron uptake and metabolism in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 17, 93–100 (2007)
- [29] Steverding, D., The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*, *Parasitol. Int.*, 48, 191–198 (2000)
- [30] Taylor, M.C., Kelly, J.M., Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection, *Parasitology*, 137, 899–917 (2010)
- [31] Taylor, M.C., McLatchie, A.P., Kelly, J.M., Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue, *Mol. Microbiol.*, 89, 420–432 (2013)
- [32] Basu, S., Horáková, E., Lukeš, J., Iron-associated biology of *Trypanosoma brucei*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1860, 363–370 (2016)

- [33] Mach, J., Tachezy, J., Šut'ák, R., Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Parasitol.*, 99, 363–364 (2013)
- [34] Tripodi, K.E.J., Menendez Bravo, S.M., Cricco, J.A., Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways, *Enzyme Res.*, 2011, 1–12 (2011)
- [35] Kořený, L., Lukeš, J., Oborník, M., Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all?, *Int. J. Parasitol.*, 40, 149–156 (2010)
- [36] Stijlemans, B., Beschin, A., Magez, S., Van Ginderachter, J.A., et al., Iron Homeostasis and *Trypanosoma brucei* Associated Immunopathogenicity Development: A Battle/Quest for Iron, *Biomed Res. Int.*, 2015, 819389 (2015)
- [37] Dobryszczycka, W., Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35, 647–654. (1997)
- [38] Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., et al., A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans, *Science*, 320, 677–681 (2008)
- [39] Beinert, H., Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures, *Science*, 277, 653–659 (1997)
- [40] Lukeš, J., Basu, S., Fe/S protein biogenesis in trypanosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1853, 1481–1492 (2015)
- [41] Coustou, V., Biran, M., Besteiro, S., Rivière, L., et al., Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, 281, 26832–26846 (2006)
- [42] Gourley, B.L., Parker, S.B., Jones, B.J., Zumbrennen, K.B., et al., Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans*, *J. Biol. Chem.*, 278, 3227–3234 (2003)

- [43] Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G.A., A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 99, 89–101 (1999)
- [44] Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K., Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 125, 211–216 (2002)
- [45] Flaspohler, J.A., Jensen, B.C., Saveria, T., Kifer, C.T., Parsons, M., A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes, *Eukaryot. Cell*, 9, 1702–1710 (2010)
- [46] Brun, R., Schönenberger, Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication., *Acta Trop.*, 36, 289–292 (1979)
- [47] Šmíd, O., Horáková, E., Vilimová, V., Hrdý, I., Cammack, R., Horvath, A., Lukeš, J., Tachezy, J., Knock-downs of Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins IscS and IscU Down-regulate the Active Mitochondrion of Procyclic *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, 281, 28679–28686 (2006)
- [48] Schulz, I., Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes, *Methods Enzymol.*, 192, 280–300 (1990)
- [49] Colasante, C., Peña Diaz, P., Clayton, C., Voncken, F., Mitochondrial carrier family inventory of *Trypanosoma brucei brucei*: Identification, expression and subcellular localisation, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 167, 104–117 (2009)
- [50] Mitra, B., Laranjeira-Silva, M.F., Perrone Bezerra de Menezes, J., Jensen, J., Michailowsky, V., Andrews, N.W., A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for *Leishmania amazonensis* Virulence, *PLoS Pathog.*, 12, (2016)

- [51] Šut'ák, R., Xu, X., Whitnall, M., Kashem, M.A., et al., Proteomic analysis of hearts from frataxin knockout mice: marked rearrangement of energy metabolism, a response to cellular stress and altered expression of proteins involved in cell structure, motility and metabolism, *Proteomics*, 8, 1731–1741 (2008)
- [52] Wirtz, E., Hoek, M., Cross, G.A., Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4626–4634 (1998)

