

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Komplex I dýchacího řetězce
v hydrogenosomech *Trichomonas vaginalis*.

Lucie Bardoňová

Diplomová práce

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jan Tachezy, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury.

V Praze, dne 2.5.2006

Lucie Bardoňová
Lucie Bardoňová

Chtěla bych poděkovat všem, kdo mi v průběhu mého studia pomáhali. Děkuji svému školiteli za trpělivost, Ivanu Hrdému za neustálou ochotu pomoci, Pavlu Doležalovi za vše, co mě naučil, Mirce Šedinové za sekvenace, Ondrovi Šmídovi a Róbertu Šuťákovi za rady a všem z naší laboratoře za to, že se s nimi dá dobře pracovat a moc nenadávají. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za to, že mi svou podporou umožnili studovat, co jsem si zvolila. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat matce přírodě za to, že dovolila odhalit alespoň nepatrnou část ze svých tajemství.

Obsah:

1. Úvod.....	4
2. Literární přehled.....	5
2.1. Metabolismus <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
2.2. Mitochondrie a hydrogenosomy.....	6
2.2.1. Mitochondrie.....	6
2.2.2. Hydrogenosomy.....	7
2.2.3. Porovnání hydrogenosomu a mitochondrie.....	9
2.3. Dýchací řetězec.....	10
2.3.2. Komplex II (sukcinát: ubichinon reduktáza).....	12
2.3.3. Komplex III (ubichinol: cytochrom c oxidoreduktáza).....	13
2.3.3.1. Cytochromy.....	13
2.3.3.2. Uložení komplexu III v membráně.....	14
2.3.4. Komplex IV (cytochrom c oxidáza).....	14
2.3.5. Mechanismus syntézy ATP.....	14
2.3.5.1. Syntéza ATP v mitochondriích.....	15
2.3.5.2. Syntéza ATP v aerobně žijících bakteriích.....	15
2.4. Komplex I prokaryot a eukaryot.....	16
2.4.1. Domény komplexu I.....	17
2.4.1.1. Periferní doména.....	17
2.4.1.2. Membránová doména.....	18
2.4.1.2.1. Podjednotka ND1.....	18
2.4.1.2.2. Podjednotky ND2, ND4 a ND5.....	18
2.4.1.2.3. Podjednotky ND3, ND4L a ND6.....	19
2.4.1.2.4. Organizace podjednotek.....	19
2.4.2. Alternativní NADH dehydrogenázy.....	20
2.4.3. Enzymatická aktivita komplexu I a mechanismy jeho inhibice.....	20
2.4.3.1. Měření enzymatické aktivity.....	20
2.4.3.2. Mechanismus inhibice.....	21
2.4.4. Prokaryotický typ komplexu I.....	21
2.4.5. Mitochondriální komplex I.....	22
2.4.5.1. Komplex I mnohobuněčných eukaryot.....	22
2.4.5.1.1. <i>Bos taurus</i>	22
2.4.5.1.2. <i>Ascaris suum</i>	22
2.4.5.2. Komplex I jednobuněčných eukaryotních organismů.....	23
2.4.5.2.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
2.4.5.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.4.5.2.3. <i>Trypanosoma brucei</i>	24
2.4.5.2.4. <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium berghei</i>	25
2.4.5.2.5. <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
2.4.6. Evoluce komplexu I.....	26
3. Cíle diplomové práce.....	27
4. Materiál a metody.....	28
4.1. Organismy.....	28
4.1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	28
4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	28
4.2. Kultivační média.....	28
4.2.1. Médium TYM (Diamond 1957).....	28

4.2.2. LB médium	28
4.2.3. SOC médium	29
4.3. Zásobní roztoky	29
4.4. Použité plasmidy.....	32
4.4.1. pGEM T – Easy	32
4.4.2. pET 28a	32
4.4.3. pMasterNeo	33
4.4.4. pTagVag	33
4.5. Molekulárně biologické techniky	34
4.5.1. Izolace gDNA <i>T. vaginalis</i>	34
4.5.2. Amplifikace DNA pomocí PCR	34
4.5.3. DNA elektroforéza	35
4.5.4. Extrakce DNA z gelu	36
4.5.5. Ligace PCR produktů do plasmidu pGEM T – Easy	36
4.5.6. Restrikce.....	36
4.5.7. Ligace DNA do expresních vektorů	36
4.5.8. Izolace plasmidové DNA pomocí metody “Maxiprep Merlin“	36
4.5.9. Výpočet koncentrace DNA.....	38
4.5.10. Transformace buněk <i>E. coli</i>	38
4.5.10.1. Kmen XL-1-Blue.....	38
4.5.10.2. Kmen BL21	38
4.5.11. Transformace <i>T. vaginalis</i>	39
4.6. Biochemické techniky	40
4.6.1. Příprava buněčných frakcí <i>T. vaginalis</i>	40
4.6.2. SDS - PAGE	41
4.6.3. Blue native gel electrophoresis (BN - PAGE)	41
4.6.4. Imunobloting analýza.....	44
4.6.4.1. Blotování proteinů na nitrocelulózovou membránu	44
4.6.4.2. Blotování proteinů na PVDF membránu.....	44
4.6.4.3. Použité primární protilátky.....	45
4.6.4.4. Použité sekundární protilátky	45
4.6.4.5. Substrát pro alkalickou fosfatázu	45
4.6.5. Solubilizace hydrogenosomů.....	46
4.6.6. Měření NADH dehydrogenázové aktivity	46
4.6.6.1. Výpočet aktivity komplexu I.....	46
4.6.7. Stanovení množství proteinů podle Lowryho	47
4.6.8. Příprava rekombinantních proteinů.....	47
4.6.8.1. Indukce exprese proteinů v bakteriích <i>E. coli</i> BL21	47
4.6.8.2. Purifikace rekombinantního proteinu.....	48
4.6.8.2.1. Příprava lyzátů buněk <i>E. coli</i> :	48
4.6.8.2.2. Chromatografie na Ni – NTA agaróze	48
4.7. Mikroskopické techniky - imunofluorescence.....	49
4.7.1. Silanizace podložních skel.....	49
4.7.2. Příprava preparátů.....	49

5. Výsledky.....	50
5.1. Buněčná lokalizace podjednotek komplexu I Tvh47 a Tvh22	50
5.1.1. Příprava plasmidů pro expresi genů Tvh22 a Tvh47 v <i>T. vaginalis</i>	53
5.1.2. Detekce rekombinantních proteinů Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3 značených hemaglutinovým tagem v buněčných frakcích.....	54
5.1.3. Detekce Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3 v buňkách <i>T. vaginalis</i> pomocí imunofluorescence.....	56
5.2. Vyhledávání dalších podjednotek komplexu I u <i>T. vaginalis</i>	58
5.2.1. Bioinformatický přístup	58
5.2.2. Expresе vytipovaných genů v <i>T. vaginalis</i>	65
5.2.2.1. Příprava plasmidů s vloženými geny pro podjednotky komplexu I	65
5.2.2.1.1. Podjednotka TvhND1 a TvhND2	65
5.2.2.1.2. Podjednotka TvhND4 a TvhND6.	67
5.2.2.2. Expresе rekombinantních proteinů v <i>T. vaginalis</i>	68
5.2.3. Expresе podjednotky 6 v bakteriích.....	69
5.2.3.1. Příprava bakteriálního expresního plasmidu s vloženým genem podjednotky TvhND6.	69
5.2.3.2. Transformace expresních bakterií BL21	70
5.2.3.3. Indukce expresе rekombinantního proteinu TvhND6-His.....	70
5.2.4. Vyhledávání podjednotek komplexu I pomocí afinitní chromatografie	71
5.2.4.1. Chromatografie na Ni – NTA koloně	71
5.2.4.1.1. Konstrukce plasmidů MasterNeo-Tvh22-His a MasterNeo-Tvh47-His	71
5.2.4.1.3. Chromatografie na Ni – NTA koloně.....	74
5.2.4.1.4. Identifikace proteinů izolovaných společně s Tvh47-His.....	75
5.2.5. Pokus o izolaci komplexu I pomocí “Blue Native Gel Electrophoresis (BN – PAGE)”	77
5.2.5.1. Volba vhodného detergentu a poměru detergent : Serva Blue G.....	77
5.2.5.2. Identifikace hydrogenosomálních komplexů rozdělených pomocí BN-PAGE.....	78
5.2.6. Purifikace komplexu I kapalinovou chromatografií.....	80
5.2.6.1. Purifikace komplexu I na monoS katexu a na hydroxyapatitu	80
5.2.6.2. Analýza proteinů kopurifikovaných s Tvh22 a Tvh47 pomocí MALDI ESI - QTOF	83
5.2.6.3. Sekvenace N – koncových aminokyselin podjednotek Tvh22 a Tvh47	84
6. Diskuze.....	87
7. Závěr.....	93
8. Seznam literatury.....	94
9. Příloha.....	104

1. Úvod

Trichomonas vaginalis je anaerobní bičíkovec z kmene Parabasala parazitující u člověka. Způsobuje onemocnění urogenitálního traktu – trichomonózu, která je nejčastějším neviróvým sexuálně přenosným onemocněním na světě (více než 170 milionů případů ročně). Trichomonáza také zvyšuje riziko infekce virem HIV a riziko onemocnění rakovinou děložního krčku (Cohen, 2000).

Trichomonády jsou anaerobní organismy, které neobsahují mitochondrii. Místo mitochondrií však mají hydrogenosomy (Lindmark & Müller, 1973), které se podílejí na karbohydrátovém metabolismu buňky. Hydrogenosomy i mitochondrie jsou orgány energetického metabolismu eukaryotických organismů, které se však liší způsobem tvorby ATP. Zatímco v mitochondriích se ke tvorbě ATP využívá průchodu elektronů dýchacím řetězcem, kde jako konečný akceptor elektronů slouží kyslík (oxidativní fosforylace), hydrogenosomy tvoří ATP výhradně na úrovni substrátové fosforylace. Způsob tvorby ATP odpovídá prostředí, ve kterém organismy žijí. Organismy s mitochondrií žijí obvykle za aerobních podmínek, oproti tomu hydrogenosomy se vyskytují výhradně u jednobuněčných eukaryot žijících v prostředí chudém na kyslík.

Zajímavou otázkou je původ hydrogenosomů. U některých skupin organismů se vyvinuly pravděpodobně ze společného endosymbiotického předka s mitochondrií, u jiných skupin se předpokládá, že hydrogenosom vznikl přeměnou kompletně vyvinuté mitochondrie v důsledku adaptace anaerobnímu prostředí. Hypotéza, že hydrogenosomy vznikly nezávisle na mitochondriích z endosymbiotické anaerobní bakterie, je méně pravděpodobná (Dyall *et al.*, 2004).

Hydrogenosomy neobsahují cytochromy ani klasický mitochondriální dýchací řetězec. Přesto u amitochondriálního parazita *Trichomonas vaginalis* byly nalezeny geny, které jsou homologní s podjednotkami komplexu I (NADH dehydrogenázy). Otázkám, jaká je jejich lokalizace a kolik a které podjednotky komplexu I se u těchto organismů skutečně nalézají, se budu věnovat ve své diplomové práci.

2. Literární přehled

2.1. Metabolismus *Trichomonas vaginalis*

Metabolismus trichomonád se liší od klasického metabolismu aerobních organismů (Miller, 1993). Díky nepřítomnosti mitochondrií trichomonády postrádají Krebsův cyklus, fosforylaci spřaženou s elektrontransportním řetězcem a enzymový aparát pro β -oxidaci mastných kyselin. Sacharidy zpracovávají glykolýzou. Energetickým výtěžkem jsou 3 molekuly ATP na 1 molekulu glukózy, protože jsou schopné využívat pyrofosfát a získávat tak 1 ATP navíc oproti běžné glykolýze (Müller, 1993).

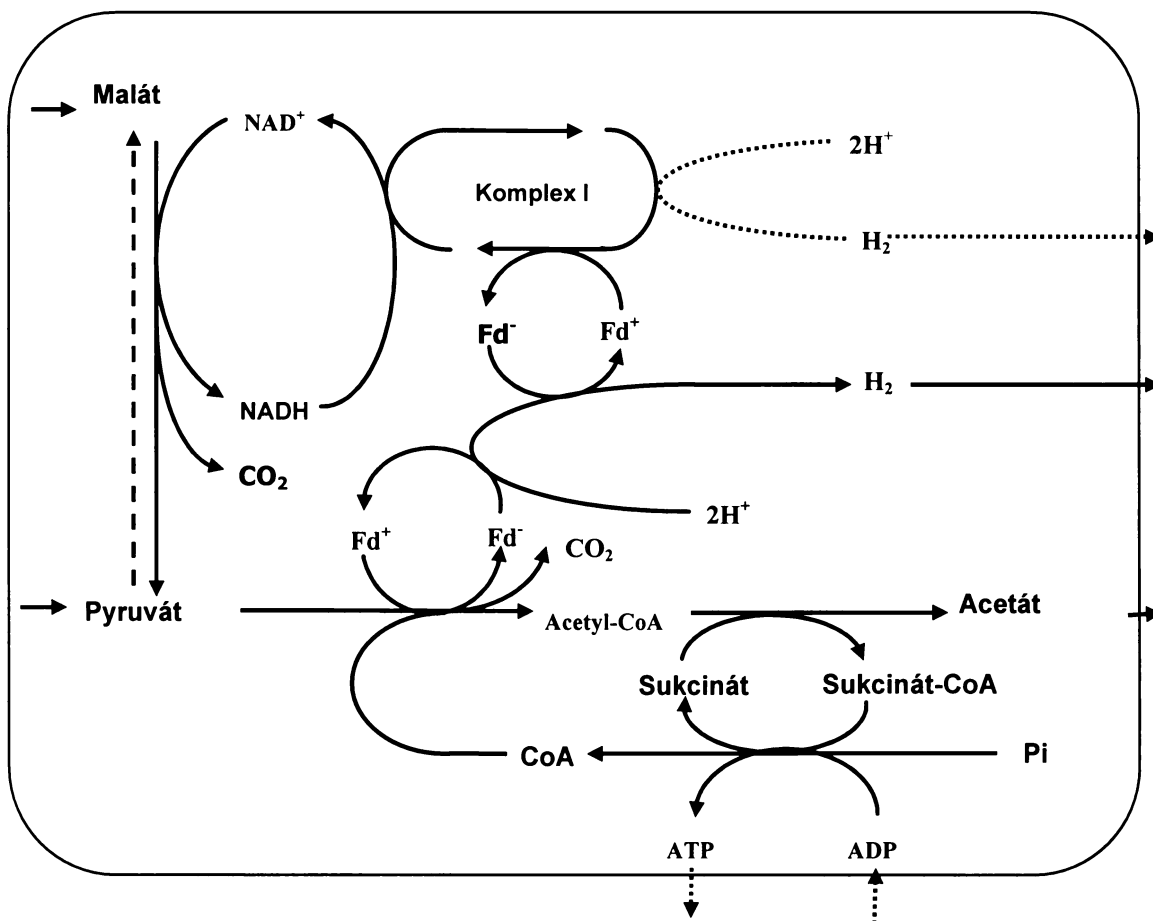
Pyruvát je v hydrogenosomech oxidativně dekarboxylován aktivitou pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázy. Uvolněné elektrony jsou tímto enzymem přeneseny na ferredoxin. Z ferredoxinu, který nese [2Fe-2S] centrum, jsou přenášeny hydrogenázou na protony a vytvoří se molekulární vodík. (Müller, 1993) (Obr.1).

Ferredoxin je zodpovědný také za citlivost trichomonád na metronidazol. Tato látka je jím redukována a mění se tak na toxickou formu. Studium rezistence vůči tomuto léčivu bylo objeveno alternativní řetězec transportu elektronů. Pro jeho přítomnost svědčí následující:

- ✓ Knock out genů pro ferredoxin se fenotypicky nijak neprojevuje, dochází k produkci vodíku (Land *et al.*, 2004).
- ✓ Kmeny bez aktivní pyruvát : ferredoxin oxidoreduktázy rovněž aktivují metronidazol, pokud je u nich přítomná NADH : ferredoxin oxidoreduktáza (Kulda, 1998).
- ✓ Plná rezistence na metronidazol se rozvíjí po úplné ztrátě funkce enzymů NADH : ferredoxin oxidoreduktázy a jablečného (malic) enzymu. (Kulda, 1998).

Obr. 1. Metabolismus hydrogenosomů

Upravené podle Kuldy, 1998



2.2. Mitochondrie a hydrogenosomy

2.2.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou místem energetického metabolismu eukaryot (Voet & Voet, 1995). V celé eukaryotické říši jsou značně morfologicky podobné. Stejně tak proteinové složení je velmi konzervativní (Lill, Nargang & Neupert, 1996).

Velikost a tvar mitochondrií je značně proměnlivý v závislosti na jejich původu a metabolickém stavu. U savců bývají elipsoidní, okolo 0,5 μm v průměru a 1 μm délky. Obsahují DNA, která má strukturu cyklické dvoušroubovice a kóduje některé mitochondriální proteiny. Mitochondrie mají hladkou vnější membránu a vnitřní membránu s četnými vchlípeninami (invaginace), která tvoří tzv. kristy. Množství a tvar krist závisí na respirační aktivitě buňky, protože proteiny podílející se na

transportu elektronů a oxidační fosforylaci jsou vázány na této vnitřní mitochondriální membráně. Vnitřní mitochondriální prostor je vyplněn matrix, gelovou hmotou s méně než 50% obsahem vody, v níž jsou lokalizovány enzymy citrátového cyklu, substráty, nukleotidové kofaktory a anorganické ionty. Mitochondrie se dělí zaškrfováním (Voet & Voet, 1995).

Většina (99%) mitochondriálních proteinů je kódována jaderným genomem. Tyto proteiny jsou syntetizovány na volných ribosomech v cytosolu jako preproteiny, které obvykle nesou N-koncové adresové sekvence umožňující jejich následný transport do mitochondrie (Lill, Nargang & Neupert, 1996). Asi 10 proteinů je kódováno mitochondriálními geny. Jsou to většinou komponenty vnitřní mitochondriální membrány. Na místo svého určení jsou vkládány po syntéze na mitochondriálních ribosomech (Lill, Nargang & Neupert, 1996).

Na transportu proteinů kódovaných jaderným genomem do mitochondrie se podílejí dva membránové komplexy, TOM (translocase of outer membrane) a TIM (translocase of inner membrane) (Lill, Nargang & Neupert, 1996). TOM je lokalizován na vnější membráně, rozpoznává preproteiny určené pro transport do mitochondrie a transportuje je přes vnější membránu (Lill & Neupert, 1996). Následně jsou preproteiny uchopeny komplexem TIM, který je v závislosti na membránovém potenciálu $\Delta\Psi$ přenesen do mitochondriální matrix (Lill, Nargang & Neupert, 1996). V matrix jsou odstraněny signální sekvence, proteiny jsou sbaleny pomocí chaperonů a dodány na místo určení (Lill, Nargang & Neupert, 1996).

Mitochondrie obsahují enzymy podílející se zejména na pochodech oxidačního metabolismu eukaryot, tj. pyruvátdehydrogenázu, enzymy Krebsova cyklu a enzymy katalyzující β -oxidaci. Jednou z nejdůležitějších vlastností je přítomnost dýchacího řetězce spojeného s oxidativní fosforylací (Voet & Voet, 1995).

2.2.2. Hydrogenosomy

Hydrogenosomy byly objeveny asi před 30 lety u trichomonád (Lindmark & Müller, 1973, 1974; Čerkasov *et al.*, 1973) a později u dalších amitochondriálních organismů žijících v anaerobním prostředí nebo v prostředí s nízkým obsahem kyslíku (van Bruggen *et al.*, 1983; Yarlett *et al.*, 1986). Zprvu byly popsány jako kulovitá tělíska (0,5 - 1 μm) obklopená jednoduchou membránou (tzv. microbodies, podobná např. peroxisomům), obsahující relativně uniformní matrix (Müller, 1973).

Následné studie odhalily, že jsou obklopeny dvěma těsně přiléhajícími membránami (|Benchimol & de Souza, 1983; Honigberg et al., 1984). Na rozdíl od mitochondrie, vnitřní membrána hydrogenosomů netvoří kristy a neobsahuje cytochromy (Lloyd, Lindmark & Müller, 1979; Paltauf & Meingassner, 1982). Na některých místech mezi membránami vznikají měchýřky, která obsahují Ca^{2+} (Benchimol et al., 1982).

Kromě jedné výjimky u nich nebyla nalezena DNA (Müller, 1988). Touto výjimkou je anaerobní nálevník *Nyctotherus ovalis*, žijící ve střevě švábů (Akhmanova et al., 1998). Vzhledem k nepřítomnosti vlastního genomu jsou všechny proteiny hydrogenosomů kódovány jaderným genomem, syntetizovány pravděpodobně na volných cytosolických ribosomech (Lahti & Johnson, 1991) a následně transportovány do hydrogenosomu.

Hydrogenosomy ve své granulózní matrix obsahují amorfni elektrondenzní jádro "core" (Kulda et al., 1986), jehož funkce není známa. Dělení hydrogenosomů probíhá stejně jako u mitochondrií zaškrčením v centrální oblasti (Benchimol et al., 1996).

Hydrogenosomy jsou stejně jako mitochondrie organely energetického metabolismu buňky podílející se na tvorbě ATP. Byly definovány podle jejich neobvyklé funkce: v anaerobních podmínkách jako substrát využívají malát a pyruvát, který odbourávají na CO_2 a acetát. Tento proces je spojen s tvorbou ATP na úrovni substrátové fosforylace (Müller, 1993). Metabolismus izolovaných hydrogenosomů je závislý na přítomnosti ADP a fosfátu, stejně jako na katalytickém množství sukcinátu (Steinbuchel & Müller, 1986).

Pyruvát (produkt glykolýzy) vstupuje do organely, kde je oxidativně dekarboxylován. Acetylová skupina formuje s koenzymem A acetyl-CoA. Tato reakce je katalyzována enzymem pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázou, což je homodimer dvou podjednotek o velikosti 120 kDa obsahující thiamin pyrofosfát a [4Fe-4S] centrum. Z acetyl-CoA je následně uvolněn volný acetát a CoA je přenesen na sukcinát. Vzniká tak sukcinyl-CoA, který slouží jako substrát pro substrátovou fosforylaci produkující ATP (Müller, 1993).

Redukční ekvivalenty pocházející z oxidace pyruvátu jsou za anaerobních podmínek přeneseny na ferredoxin. Z ferredoxinu jsou poté enzymem hydrogenázou předány na protony, čímž vzniká vodík. Za aerobních podmínek slouží jako akceptor elektronů kyslík, který je redukován pravděpodobně na H_2O_2 (Müller, 1993).

Hydrogenosomy mohou využívat jako substrát malát, který je oxidativně dekarboxylován na pyruvát aktivitou jablečného enzymu (Drmotá *et al.*, 1996), který předává elektrony na NAD⁺. Reoxidace NADH + H⁺ je katalyzována aktivitou NADH: ferredoxin oxidoreduktázy (Müller, 1993).

2.2.3. Porovnání hydrogenosomu a mitochondrie

Mezi hydrogenosomy a mitochondriemi je mnoho rozdílů, ale také podobností (Tab. 1), které nasvědčují tomu, že obě organely pocházejí ze společného endosymbiotického předka. Nejvýznamnějšími společnými znaky jsou přítomnost dvojité membrány, obdobný mechanismus translokace proteinů z cytosolu do hydrogenosomů a přítomnost kaskády proteinů zodpovědných za tvorbu FeS center. Důležitým rozdílem je přítomnost pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázy a hydrogenázy v hydrogenosomech.

Tab. 1 Vlastnosti mitochondrie a hydrogenosomu

	mitochondrie	hydrogenosomy
dvojitá membrána	ano	ano
translokace proteinů	ano	ano
komplex I	ano	ano (*)
tvorba FeS proteinů	ano	ano
pyruvát jako substrát	ano	ano
frataxin	ano	ano
produkce acetyl-CoA	ano	ano
produkce ATP	oxidativní fosforylace	substrátová fosforylace
Krebsův cyklus	ano	ne
cytochromy	ano	ne
F0F1 ATPáza	ano	ne
β - oxidace	ano	ne
močovinový cyklus	ano	ne
štěpení glycinu	ano	ano
kardiolipin	ano	ne
DNA	ano	ne (**)
hydrogenáza	ne	ano
Pyruvát : ferredoxin oxidoreduktáza	ne	ano

(*) V hydrogenosomech *T. vaginalis* byly objeveny podjednotky homologní komplexu I.

(**) DNA byla nalezena u hydrogenosomů anaerobního nálevníka *Nyctotherus ovalis* žijícího ve střevě švábů (Akhmanova *et al.*, 1998)

2.3. Dýchací řetězec

Reakce dýchacího řetězce tvoří součást energetického metabolismu buňky. Elektrony uvolňující se v procesech glykolýzy, Krebsova cyklu, β -oxidace a komplexem pyruvát dehydrogenázy jsou přenášeny z redukované formy koenzymů NAD a FAD, tj. z $\text{NADH} + \text{H}^+$ a FADH_2 na molekulární kyslík. V případě glykolýzy je přenos elektronů na tyto koenzymy katalyzován glykolytickými enzymy glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázou a pyruvátdehydrogenázou. V průběhu Krebsova cyklu je přenos elektronů závislý na aktivitě isocitrátdehydrogenázy, 2-oxoglutarátdehydrogenázy, sukcinátdehydrogenázy a malátdehydrogenázy. Produktem těchto reakcí je 10 $\text{NADH} + \text{H}^+$ a 2 FADH_2 na 1 molekulu glukózy.

Dříve než elektrony zredukují O_2 na H_2O , vstupují do elektronového transportního řetězce, kde místo přímého přenosu na O_2 procházejí čtyřmi proteinovými komplexy obsahujícími redoxní centra s postupně se zvyšující afinitou k elektronům. Z komplexu I a II jsou elektrony přenášeny ke komplexu III koenzymem Q (CoQ, ubichinon, vyskytuje se u všech dýchajících organismů) a z komplexu III na komplex IV cytochromem c. Tím je celkově velká změna volné energie rozdělena do tří menších "balíčků", z nichž každý je spřažen se syntézou ATP. Výsledkem oxidace každého $\text{NADH} + \text{H}^+$ je syntéza 3 ATP, oxidace FADH_2 pak 2 ATP (Voet & Voet, 1995).

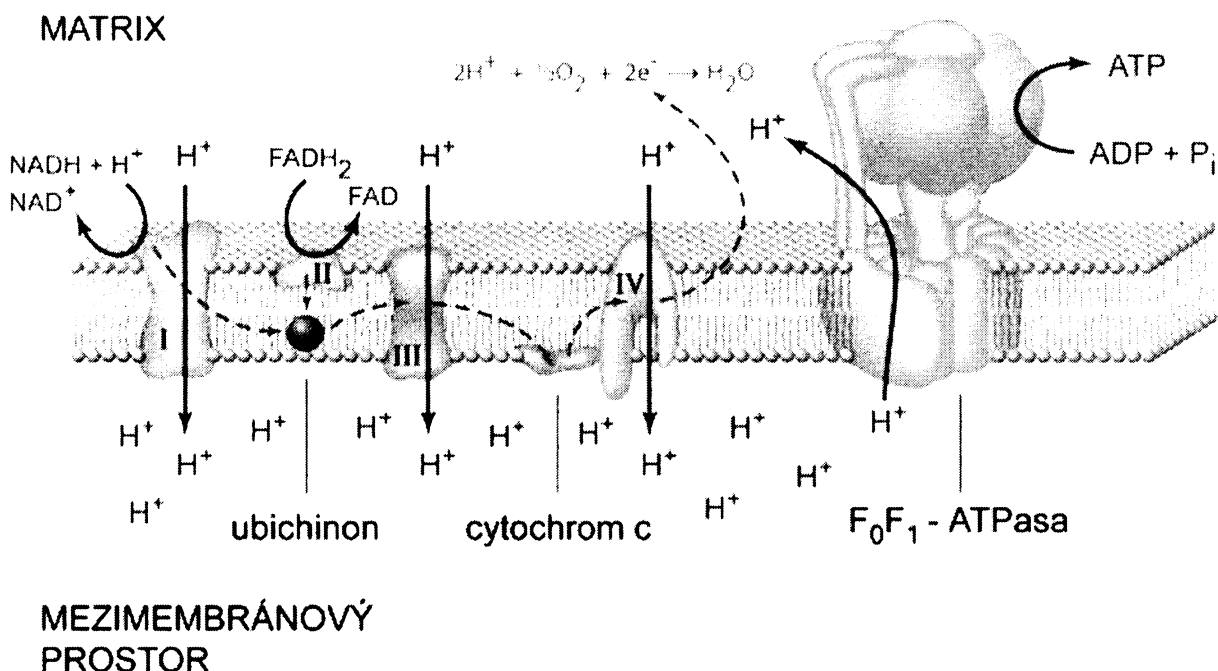
Každý komplex se skládá z několika bílkovinných složek (Obr. 2), které jsou spojeny s různými redoxně aktivními prostetickými skupinami s postupně vzrůstajícím redoxním potenciálem. Všechny komplexy se mohou vnitřní mitochondriální membránou volně pohybovat, ale nevytvářejí vyšší stabilní struktury. Jednotlivé komplexy nejsou přítomny v ekvivalentních poměrech (Voet & Voet, 1995).

Dýchací řetězec tedy zajišťuje zpětnou oxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$. Většina $\text{NADH} + \text{H}^+$ je produkována mitochondriální matrix v citrátovém cyklu, ale část $\text{NADH} + \text{H}^+$ pocházející z glykolýzy se tvoří i v cytosolu. Vnitřní mitochondriální membrána však neumožňuje transport $\text{NADH} + \text{H}^+$, proto jsou z cytosolového $\text{NADH} + \text{H}^+$ transportovány do mitochondrie pouze elektrony, a to pomocí kyvadlového glycerolfosfátového nebo malát - aspartátového systému.

Transport elektronů dýchacím řetězcem lze inhibovat rotenonem (rostlinný jed), amytalem (barbiturát), antimycinem A a kyanidem (Voet & Voet, 1995).

Obr. 2. Dýchací řetězec

Převzato z Výkladového slovníku biochemických pojmů, Milan Kodíček



2.3.1. Komplex I (NADH: ubichinon oxidoreduktáza)

Komplex I (NADH: ubichinon oxidoreduktáza; EC 1.6.5.3) je prvním článkem dýchacího řetězce katalyzujícím oxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$ koenzymem Q. Je to největší a nejsložitější bílkovinná složka vnitřní mitochondriální membrány (cca. 850 kDa) tvaru písmene L (Obr. 3) tvořená polypeptidovými podjednotkami, jednou molekulou flavinmononukleotidu (aktivní prostetická skupina) a 8-9 Fe-S centry (Yano, 2002). Vyskytuje se u eukaryot a bakterií. Katalyzuje vstupní reakci v řetězci transportu elektronů, přenos elektronů z $\text{NADH} + \text{H}^+$ na ubichinon:



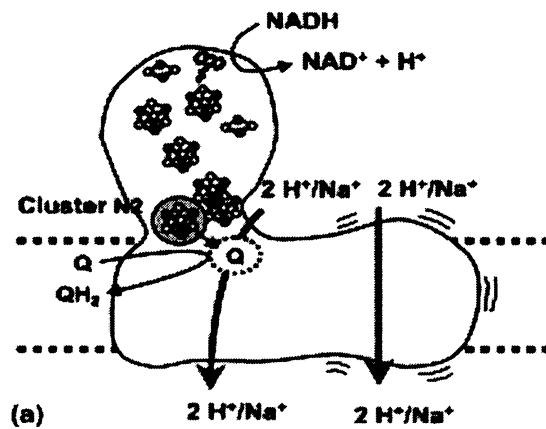
Fe-S centra se účastní transportu elektronů (jsou redoxně aktivní). Komplex I je tedy redoxní pumpa využívající oxidoredukční potenciál k translokaci 2-4 $\text{H}^+/2\text{e}^-$ přes membránu a přispívající tak k produkci energie (Yano, 2002).

Mnoho neurodegenerativních chorob (např. Leighův syndrom, Parkinsonova choroba) je spojeno s deficiencí komplexu I (Smeitink et al., 2001).

Podrobněji se komplexu I věnuje kapitola 2.4.

Obr. 3. Komplex I

Upravené podle Yana, 2002



2.3.1.1 Ubichinon

Ubichinon (koenzym Q) je isoprenový derivát nacházející se v bakteriálních a mitochondriálních membránách, kde slouží k přenosu protonů i elektronů mezi komplexem I a III. Je to jediný přenašeč dýchacího řetězce, který se kovalentně neváže k žádnému proteinu.

Díky dlouhému (5,5 nm) uhlovodíkovému řetězci z isoprenových jednotek je ubichinon rozpustný v hydrofobním jádře fosfolipidové dvojvrstvy. Isoprenový řetězec je ve vnitřní mitochondriální membráně orientován buď kolmo k jejímu povrchu, nebo rovnoběžně s ním. Chinonová část molekuly může v prostoru membrány konat jak rotační a kývavé pohyby, tak i cirkuluje od jednoho povrchu membrány k druhému.

2.3.2. Komplex II (sukcinát: ubichinon reduktáza)

Tento komplex katalyzuje oxidaci FADH_2 koenzymem Q. Při této redoxní reakci se neuvolňuje dostatečné množství volné energie potřebné k syntéze ATP, její funkcí je pouze dodávat elektrony z FADH_2 do řetězce transportu elektronů.

Sukcinátdehydrogenáza je jediným enzymem citrátového cyklu vázaným na vnitřní mitochondriální membránu. Skládá se ze dvou hydrofilních podjednotek, z nichž každá obsahuje jeden kovalentně vázaný FAD a tři Fe-S-centra. Podjednotky tvoří komplex II spojením se dvěma transmembránovými proteiny společně vázajícími jednu hemovou skupinu (tvoří tak cytochrom b_{560}).

Sukcinátdehydrogenáza účinně katalyzuje tok elektronů pouze ve směru ze sukcinátu na CoQ, čímž zabraňuje zpětnému běhu citrátového cyklu za anaerobních podmínek (Voet & Voet, 1995).

2.3.3. Komplex III (ubichinol: cytochrom c oxidoreduktáza)

Ubichinol: cytochrom c oxidoreduktáza katalyzuje oxidaci redukováného CoQ cytochromem c. Obsahuje dva cytochromy typu b, jeden cytochrom c_1 a jedno [2Fe-2S] centrum. Tímto komplexem jsou z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru pumpovány 2 H^+ (Voet & Voet, 1995).

2.3.3.1. Cytochromy

Cytochromy jsou hemové proteiny transportu elektronů, které mohou být redukovány pouze jedním elektronem. Jsou přítomné ve všech organismech kromě několika málo typů obligátních anaerobů. Obsahují hemovou skupinu, v níž se atomy Fe nacházejí v oxidačních stavech Fe^{II} a Fe^{III} . V membránách se nalézají cytochromy tří druhů (a,b,c), které se rozlišují pomocí vlnové délky vrcholu α (jeden z vrcholů absorpčních spekter v oblasti viditelného záření). Cytochromy b komplexu III mají 2 vlnové délky α -maxim: 562 nm (b_K , B_{562}) a 566 nm (b_T či b_{566}).

Skupiny cytochromů se liší také rozdílně substituovaným porfyrinovým kruhem s koordinačně vázaným redoxně aktivním atomem železa. Cytochromy typu b obsahují protoporfyrin IX (také součást hemoglobinu). V hemové skupině cytochromů c jsou k vinylovým skupinám připojeny thiolové skupiny cysteinu v místě původních dvojných vazeb, takže tvoří thioesterové vazby s proteinem. Hem a obsahuje dlouhý hydrofobní řetězec isoprenových jednotek připojených k porfyrinu a formylovou skupinu místo methylu.

Cytochrom c je periferní membránový protein. Střídavě se váže na cytochrom c_1 komplexu III a cytochromoxidázu (komplex IV) a funguje mezi nimi jako přenašeč elektronů. Elektrony může přenášet až na vzdálenost 1 - 2 nm. Vazebné místo zahrnuje několik konstantních lysinových zbytků (Voet & Voet, 1995).

2.3.3.2. Uložení komplexu III v membráně

Komplex III je v membráně uložen asymetricky, cytochrom c1 a nehemový Fe - S protein (Rieske) jsou lokalizovány na vnějším povrchu membrány, zatímco cytochrom b je transmembránový. Cytochromy chrání své hemové skupiny před nespecifickým přenosem elektronů (Voet & Voet, 1995).

2.3.4. Komplex IV (cytochrom c oxidáza)

Tento poslední článek dýchacího řetězce katalyzuje jedoelektronovou oxidaci čtyř po sobě následujících molekul redukováného cytochromu c s průvodní čtyřelektronovou redukcí jedné molekuly kyslíku jako konečným akceptorem elektromů při jejich transportu. Cytochrom c oxidáza je zapuštěna ve dvojné vrstvě lipidů, je to dimerní transmembránový protein zavinutého tvaru vyčnívající na cytosolové straně membrány. V blízkosti středu je dutina tvořící vazebné místo pro cytochrom c, které obsahuje několik zbytků asparagové nebo glutamové kyseliny, interagujících s lysinových kruhem cytochromu c. Komplex obsahuje čtyři redoxně aktivní centra: dva hemy typu a a dva atomy Cu (oxidační stavy +1 a +2). Do mezimembránového prostoru jsou pumpovány (2+2) H⁺ (Voet & Voet, 1995).

2.3.5. Mechanismus syntézy ATP

Syntéza ATP je nejdůležitějším úkolem buněčného metabolismu. Recentní organismy používají různé mechanismy:

- ✓ Substrátová fosforylace (například při anaerobní glykolýze; nepotřebuje vnější finální akceptor elektronů).
- ✓ Oxidativní fosforylace (oxidace organických látek; kyslík je finálním elektronovým akceptorem).
- ✓ Anaerobní respirace (tvorbu ATP zajišťuje pouze komplex I; finálním akceptorem elektronů je místo kyslíku fumarát).
- ✓ Fotofosforylace (ke zisku energie používá světlo).

2.3.5.1. Syntéza ATP v mitochondriích

V mitochondriích probíhá oxidativní fosforylace využívající energii protonového gradientu. Reakce je katalyzována F_0F_1 ATPázou. ATPáza je transmembránový protein složený z mnoha podjednotek, které tvoří dva funkční sektory F_0 a F_1 . F_0 je ve vodě nerozpustný transmembránový protein složený ze čtyř či pěti podjednotek obsahujících kanály pro translokaci protonů. F_1 je ve vodě rozpustný periferní membránový protein složený z pěti druhů podjednotek a obsahující katalytické místo pro syntézu ATP. ATPáza je poháněna protonovým gradientem (Voet & Voet, 1995).

2.3.5.2. Syntéza ATP v aerobně žijících bakteriích

U bakterií, ve kterých se nevyskytují mitochondrie, probíhá stejný proces oxidativní fosforylace jako v mitochondriích eukaryontních organismů. Enzymy oxidující $NADH + H^+$ na NAD^+ a přenášející elektrony na kyslík jsou umístěny v bakteriální membráně. Pohyb elektronů přes membránu je spojen s výdejem protonů z buňky. Pohyb protonů zpět do buňky je spojen se syntézou ATP. Enzym, který se na tomto podílí, je ve své struktuře a funkci identický s mitochondriálním F_0F_1 ATPázovým komplexem.

2.4. Komplex I prokaryot a eukaryot

Existují dva hlavní typy komplexu I, mitochondriální a bakteriální. Oba typy se u různých organismů liší především počtem podjednotek (Tab.2), počtem a typem kofaktorů, buněčnou lokalizací a druhem inhibitorů. Minimální počet podjednotek nutný pro primární funkci komplexu I (oxidace NADH + H⁺ a translokace protonů) je 14. Toto podjednotkové složení je nalézáno u bakterií (Yano, 2002).

Tab. 2 Známé podjednotky mitochondriálního a bakteriálního komplexu I

	mitochondrie hovězího srdce	bakterie	<i>T. brucei</i>	kofaktory, Fe-S centra, funkce
periferní doména	51 kDa	Nqo1/NuoF	51 kDa	NADH, FMN, centrum N3
	24 kDa	Nqo2/NuoE		centrum N1a
	75 kDa	Nqo3/NuoG		centra N1b, N5, N4
spojující část	9 kDa			
	49 kDa	Nqo4/NuoD	33 kDa (ND7)	vazebné místo pro inhibitor/ubichinon
	30 kDa	Nqo5/NuoC		
	PSST, 20 kDa	Nqo6/NuoB	20 kDa	centrum N2, vazebné místo pro inhibitor/ubichinon
	TYKY, 23 kDa	Nqo9/NuoI	15 kDa (ND8)	centrum N6a, N6b
přídavné podjednotky	39 kDa			vazebné místo pro nukleotidy
	AQDQ			cAMP-závislá fosforylace
	SDAP			přenos acylu
	B16.6			regulace apoptózy
membránová doména	ND1	Nqo8/NuoH		vazebné místo pro ubichinon (?)
	ND2	Nqo14/NuoN		kanál H ⁺ nebo Na ⁺ (?)
	ND4	Nqo13/NuoM	38 kDa	kanál H ⁺ nebo Na ⁺ , vazebné místo pro ubichinon (?)
	ND5	Nqo12/NuoL	61 kDa	kanál H ⁺ nebo Na ⁺ , vazebné místo pro ubichinon (?)
	ND3	Nqo7/NuoA		
	ND4L	Nqo10/NuoJ		
	ND6	Nqo10/NuoJ		vazebné místo pro ubichinon (?)
	43 podjednotek, cca. 1000 kDa	13-14 podjednotek, cca. 500 kDa		

2.4.1. Domény komplexu I

Komplex I má tvar písmene L a tento unikátní tvar je společný všem prokaryotickým i eukaryotickým komplexům I. Enzym je tvořen 2 hlavními částmi:

- ✓ hydrofilní periferní část vyčnívající z membrány do matrix mitochondrií nebo cytoplasmy bakterií ($I\alpha$)
- ✓ hydrofobní část, která je zapuštěná do membrány ($I\beta$).

Každá doména je zodpovědná za různé funkce (Yano, 2002).

2.4.1.1. Periferní doména

Periferní část komplexu I obsahuje většinu redoxních kofaktorů, FMN a 8 nebo 9 Fe-S center, která slouží k přenosu elektronů z $\text{NADH} + \text{H}^+$ na ubichinon se odehrává na této části (Yano, 2002). Účinkem chaotropních reagentů se periferní doména dělí na 2 subfrakce (Hatefi, 1985):

- ✓ frakce flavoproteinu - podjednotky o molekulové velikosti 51, 24 a 9 kDa. Obsahuje FMN a 2 Fe-S centra.
- ✓ frakce Fe-S proteinu.

Z mitochondrie hovězího srdce byly izolovány dva odlišné enzymaticky aktivní subkomplexy ($I\alpha$ a $I\lambda$). Oba odpovídají periferní části komplexu I. Jsou složené z 23 ($I\alpha$) a 15 podjednotek ($I\lambda$) (Finel et al., 1992; Pilkington et al., 1993).

Transport elektronů je iniciován aktivitou katalytického centra, které odpovídá podjednotkám 51- a 24 kDa (viz. Tab.2). $\text{NADH} + \text{H}^+$ je oxidováno pomocí FMN. Elektrony poté procházejí řetězcem Fe-S center. Sekvence jejich průchodu tímto řetězcem však zůstává neznámá. Nakonec jsou elektrony předány subjednotkám spojujícího fragmentu (viz. dále), kde dochází k jejich přenosu na ubichinon.

Spojovací segment byl izolován z komplexu I bakterie *Escherichia coli*, kde je složen z podjednotek NuoB (v případě mitochondrie PSST), NuoCD (49 + 30kDa) a Nuol (TYKY) (Leif et al., 1995). Podjednotka TYKY obsahuje 2 x [4Fe-4S] centra (N6a a N6b) (Dupuis et al., 1991; Yano et al., 1999), podjednotka PSST [4Fe-4S] centrum vázající motiv (Arizmendi et al., 1992).

Je pravděpodobné, že [4Fe-4S] centrum subjednotky nuoB (N2) na konci tohoto řetězce předává elektrony ubichinonu (Yano, 2002). Předpokládá se, že transport elektronů z centra N2 na ubichinon (Obr. 3) je spojen s translokací protonů (Yano, 2002).

2.4.1.2. Membránová doména

Hlavními složkami membránové domény (= subkomplex I β) je sedm plně konzervativních hydrofobních podjednotek ND1-6 a ND4L. Doména obsahuje více než 50 transmembránových α -helixů a je odpovědná za redukci ubichinonu a za transport protonů. Specifické funkce jednotlivých podjednotek nejsou známy (Yano, 2002).

2.4.1.2.1. Podjednotka ND1

Tato podjednotka se pravděpodobně podílí na vazbě ubichinonu, i když její přesná role je zatím nejasná. Byly provedeny pokusy s navázáním inhibitorů, např. fotoafinitních analogů rotenonu (Earley & Ragan, 1984; Earley et al., 1987) a nověji analogů pyradabenu [³H]TDP (Schuler et al., 1999). Navázání těchto inhibitorů na podjednotku ND1 není spojeno s inhibicí celkové enzymové funkce a nebyla pozorována žádná saturace. Přesto se zdá, že podjednotka ND1 je nějakým způsobem zapojena do interakcí mezi komplexem I a jeho inhibitory nebo ubichinonem (Yano, 2002).

2.4.1.2.2. Podjednotky ND2, ND4 a ND5

Všechny tyto podjednotky jsou vzájemně homologní, proto se předpokládá, že vznikly během evoluce duplikací ze společného předka (Fearnley & Walker, 1992). Jsou také homologní k jednoduchým polypeptidovým Na⁺/H⁺ antiporterům některých bakterií (Kikuno & Miyata, 1985). Proteiny velmi podobné ND2 a ND5 podjednotce byly nalezeny i v mnohopodjednotkových Na⁺/H⁺ antiporterech (Hiramatsu et al., 1998; Ito et al., 1999). Z těchto podobností lze usoudit, že formují iontové kanály pro Na⁺ nebo H⁺ také v komplexu I (Yano, 2002). Podjednotka ND4 tvoří mimo jiné i část vazebného místa pro ubichinon (Degli Esposti et al., 1994; Carelli et al., 1997, 1999; Brown et al., 2000).

2.4.1.2.3. Podjednotky ND3, ND4L a ND6

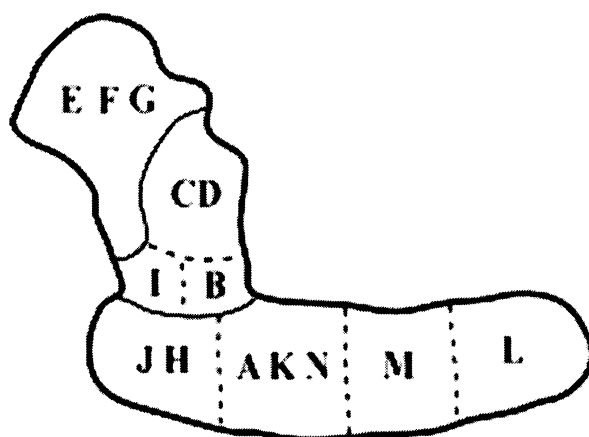
Podjednotka ND3 je pravděpodobně zapojena v translokaci protonů (Yano, 2002), zatímco podjednotka ND6 ve vazbě ubichinonu (Chinnery et al., 2001). ND4L je homologem k C-terminálnímu regionu podjednotky HyfE enzymu formát hydrogenlázy-2 bakterie *E. coli* (Finel, 1998).

2.4.1.2.4. Organizace podjednotek

Za přítomnosti detergentů se subkomplex I β odpovídající membránové doméně rozpadá na 2 hlavní části: jedna obsahuje ND1, ND2, ND3 a ND4L, druhý fragment pak ND4 a ND5 (Sazanov et al., 2000). Podjednotka ND1, která byla v raných stádiích evoluce pravděpodobně spojená s 49 kDa a PSST podjednotkou (Friedrich & Scheide, 2000), je těsně spojená s periferní doménou komplexu I, naproti tomu ND5 se nalézá na vzdáleném konci membránového ramena (Sazanov & Walker, 2000) (Obr. 4).

Obr. 4. Strukturální organizace podjednotek komplexu I

Písmena značí jednotlivé podjednotky v bakteriální nomenklatuře (NuoE – NuoL, viz Tab. 2). Podjednotky katalytické domény (NuoE, NuoF, NuoG) a spojovacího segmentu (NuoB, NuoC, NuoD, NuoI) tvoří periferní část, zbylé podjednotky membránovou doménu. Převzato z Holta *et al.*, 2003



2.4.2. Alternativní NADH dehydrogenázy

Alternivní NADH dehydrogenázy (NDH-2) lze najít jako doplněk komplexu I u prokaryot, hub a rostlin (Kerscher, Okun & Brandt, 1999; Young *et al.*, 1981). Jsou složené pouze z 1 podjednotky a 1 molekuly nekovalentně vázaného FAD jako redoxního kofaktoru.

Ačkoli nejsou homologní ke komplexu I, katalyzují stejnou reakci. Na rozdíl od komplexu I alternativní dehydrogenázy nepřispívají ke vzniku transmembránového protonového gradientu (Kerscher, 2000). NADH + H⁺ vazebné místo alternativní dehydrogenázy kvasinky *Yarrowia lipolytica* je orientováno směrem k mezimembránovému povrchu vnitřní mitochondriální membrány (Kerscher, Okun & Brandt, 1999), což znamená, že tato dehydrogenáza nemůže zastoupit komplex I v oxidaci NADH + H⁺ generovaného v mitochondriální matrix (Kerscher *et al.*, 2002). Zajišťuje přenos elektronů z cytoplasmatického NADH + H⁺ do respiratorního ubichinonového řetězce (Kerscher *et al.*, 2002).

V případě alternativních dehydrogenáz rostlinných mitochondrií a kvasinky *Neurospora crassa* je NADH + H⁺ vazebné místo orientováno na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány (Marres *et al.*, 1991; de Vries *et al.*, 1992).

Alternivní NADH dehydrogenázy jsou necitlivé na klasické inhibitory komplexu I jako je například rotenon nebo piericidin A a mohou soutěžit s komplexem I o substráty NADH + H⁺ a ubichinon (Kerscher, Okun & Brandt, 1999). Pro svou katalytickou aktivitu nevyžadují žádné přídavné komponenty (Kerscher, Eschemann, Okun & Brandt, 2001).

2.4.3. Enzymatická aktivita komplexu I a mechanismy jeho inhibice

2.4.3.1. Měření enzymatické aktivity

K měření aktivity komplexu I se obvykle jako substrát (akceptor elektronů) používají analogy ubichinonu, jako například ubichinon-1, ubichinon-2 nebo *n*-decylubichinon. Nevýhodou je, že tyto analogy akceptují elektrony i z nefyziologických míst a aktivity NADH: ubichinon oxidoreduktázy a aktivity protonové pumpy se tak liší v závislosti na použitém typu analogu ubichinonu (Degli Esposti *et al.*, 1996).

2.4.3.2. Mechanismus inhibice

Až na několik výjimek známé inhibitory blokují transport elektronů z centra N2 na ubichinon (Yano, 2002). Vazebná doména komplexu I pro ubichinon a inhibitory má tvar velké prohlubně (Miyoshi, 2001) a nalézá se především na podjednotce PSST, 49 kDa a ND1 podjednotce (Darrouzet & Dupuis, 1997; Dupuis et al., 2001; Prieur et al., 2001; Ahlers et al., 2000).

Mezi známé inhibitory komplexu I patří rotenon, piericidin A, bullatacine, fenazaquin a fenpyroxomate (Yano, 2002). Tyto inhibitory nemají inhibující účinek na alternativní NADH dehydrogenázy.

2.4.4. Prokaryotický typ komplexu I

NADH dehydrogenázy prokaryotních organismů byly studovány na modelu *E. coli*, *Parraccocus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* a *Thermus thermophilus* (Sled et al., 1993). Tyto enzymy jsou kódovány operonem *nuo* (Weidner et al., 1993).

Bakteriální NADH dehydrogenáza podobná mitochondriálnímu komplexu I je nazývána NDH-1. Vykazuje značnou genetickou, spektrální a kinetickou podobnost k mitochondriálnímu typu komplexu I (Trumpower, 1990; Yagi, 1991). Obsahuje FMN a Fe-S centra (N1a, N1b, N2, N3, N4 a pravděpodobně N5) (Sled et al., 1993). U purpurové ftoheterotrofní bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, u *E. coli* a u *Klebsiella pneumoniae* je schopná jako substrát využívat i deaminoNADH (Matsushita et al., 1987).

Některé skupiny enzymové rodiny NDH-1 mají rozmanitější skladbu podjednotek a různý počet a typ kofaktorů a fyziologických substrátů (např. translokují Na^+ místo H^+ - Steuber et al., 2000). V autotrofních bakteriích komplex I katalyzuje zpětnou reakci z chinonu na NAD^+ (Aleem & Lees, 1963).

Rozmanitost bakteriálního komplexu I a diverzita enzymů fylogeneticky příbuzných rodině komplexu I poskytuje nový náhled na strukturálně-funkční vztahy komplexu I.

2.4.5. Mitochondriální komplex I

Nejintenzivněji byl prostudován komplex I pocházející z mitochondrií srdce hovězího dobytka (Hafeti, 1985; Walker, 1992), houby *Neurospora crassa* (Weiss et al., 1991; Schulte, 2001; Videira & Duarte, 2001) a kvasinky *Yarrowia lipolytica* (Kerscher et al., 2001).

Biosyntézy komplexu I (transkripce, translace, transport, vkládání kofaktorů, skládání) se účastní více než 100 genů. Jednotlivé procesy musí být přesně regulovány, aby odpovídaly různým stupňům metabolické aktivity v jednotlivých tkáních a buňkách (Yano, 2002).

2.4.5.1. Komplex I mnohobuněčných eukaryot

2.4.5.1.1. *Bos taurus*

Komplex I z mitochondrií hovězího srdce je složen ze 43 podjednotek o celkové molekulární velikosti ~1000 kDa. Většina podjednotek je kódována v jaderné DNA (nDNA). Pouze sedm podjednotek (ND1-6 a ND4L) je kódováno mitochondriální DNA (mtDNA). Tyto podjednotky jsou hydrofobní a slouží k uchycení komplexu v membráně (Yano, 2002).

Kromě klasického $\text{NADH} + \text{H}^+$ je komplex I schopen jako substrát využívat i NADPH, z něhož přenáší elektrony na ferrikyanid. Tato reakce ale dosahuje pouze 0,13 % aktivity přenosu elektronů z $\text{NADH} + \text{H}^+$ na ubichinon (Hafeti, 1985). Kofaktorem této dehydrogenázy je FMN v množství 1 molekula FMN na 650000 Da enzymu.

Komplex I může být inhibován capsaicinem, jeho syntetickými analogy a 4-(4-tert-butyl-fenoxy)-N-(3,4-dimetoxy-benzyl)-benzamidem (Yagi, 1990).

2.4.5.1.2. *Ascaris suum*

Zvláštní typ komplexu I se nachází u mnohobuněčných parazitů, kteří se během svého životního cyklu musí adaptovat na prostředí s různým obsahem kyslíku. Příkladem takového parazita je nematod *Ascaris suum*. Jeho vývojová stádia využívají klasický aerobní metabolismus zajišťovaný mitochondrií. Naproti tomu dospělci se musí vyrovnat s nízkou tenzí kyslíku, která je v trávicí soustavě jejich hostitele (Kita et al., 2001).

Komplex I těchto parazitů je schopný využívat odlišné chinony. Za aerobních podmínek přenáší elektrony na klasický ubiquinon. Během anaerobní respirace slouží k přenosu redukčních ekvivalentů rhodochinon, nízkopotenciální akceptor elektronů (Herwerden, Blair & Agatsuma, 2000). Protože je i tento přenos elektronů spojen s translokací protonů, dochází k syntéze ATP. Efektivita je ovšem nižší než u klasické respirace (Kita et al., 2001).

2.4.5.2. Komplex I jednobuněčných eukaryotních organismů

2.4.5.2.1. *Yarrowia lipolytica*

Komplex I této kvasinky je složený z přibližně 35 podjednotek (Djafarzadeh et al., 2000), je schopen jako akceptor elektronů využívat kromě ubiquinonu také decylubichinon a hexaminruthenium(III)-chlorid (Kashani-Poor, Kerscher, Zickermann & Brandt, 2001).

Pomocí elektronové paramagnetické rezonanční (EPR) spektroskopie bylo identifikováno 5 Fe-S center, a to N1, N2, N3, N4 a N5 (Kerscher et al., 2002). N1 je [2Fe-2S] centrum vykazující EPR spektrum při teplotách nad 30 K, ostatní jsou tetranukleárního typu a jsou detekována při teplotách pod 20 K (Kerscher et al., 2002). Centrum N5 je jediné detekovatelné při teplotách pod 10 K. Podobné centrum bylo nalezeno pouze v komplexu I hovězího srdce (Ohnishi, 1998) a komplexu pocházejícím z *Rhodobacter sphaeroides* (Sled et al., 1993).

Sedm základních podjednotek komplexu I odpovídá 75-, 51-, 49-, 30-, 24-kDa, TYKY a PSST podjednotce komplexu I mitochondrie hovězího srdce (Kerscher et al., 2002).

Kromě klasického komplexu I má *Y. lipolytica* také alternativní NADH:ubichinon oxidoreduktázu NDH-2. Pokusy s přesměřáním této dehydrogenázy na vnitřní stranu vnitřní mitochondriální membrány pomocí připojení N-terminální cílové mitochondriální sekvence k podjednotce NUAM (75 kDa) ukázaly, že takto pozměněný enzym může nahradit funkci komplexu I, jehož ztráta je v normálním případě pro buňku letální. Vnitřně orientovaná NDH2 také umožňuje buňce růst i v přítomnosti inhibitoru komplexu I 2-decyl-4-quinazolinylní aminu (DQA).

2.4.5.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae je kvasinka adaptovaná na alkoholové kvašení (Lagunas, 1986), která neobsahuje komplex I. Byly zde ale nalezeny 3 homology alternativní NADH

dehydrogenázy kódované geny *SCNDI1*, *YMR145c* a *YDL085w* (Kerscher Okun & Brandt, 1999). Dva z nich (*YMR145c* a *YDL085w*) mají vnější orientaci (Luttik et al., 1998; Small & McAlister-Henn, 1998), zatímco jeden je orientován na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány a může být považován za metabolického zástupce komplexu I (Marres et al., 1991; de Vries et al., 1992). Je to jednoduchý polypeptidový řetězec obsahující jednu molekulu nekovalentně vázaného FAD. Je kódován genem *SCNDI1* (de Vries et al., 1992).

Protein *SCNDI1* je evolučně vzdálený od ostatních tří enzymů nalézáných u hub. Předpokládá se, že společný předek houbových alternativních NADH:ubichinon oxidoreduktáz měl externí orientaci a že interně orientovaná forma NDH2 vznikla získáním cílových sekvencí pro mitochondriální matrix (Kerscher Okun & Brandt, 1999).

2.4.5.2.3. *Trypanosoma brucei*

Prvok *T. brucei* je dvojhospitelský parazit, který obsahuje jedinou mitochondrii, jejíž metabolická aktivita a struktura se mění v závislosti na životním cyklu parazita. Mitochondrie krevních forem trypanosom nemají aktivní enzymy energetického metabolismu, tj. Krebsova cyklu a dýchacího řetězce. Jejich kristy jsou tubulární. Účastní se pouze na udržování oxidoredukčního potenciálu. Energetická potřeba je pokrytá glykolýzou glukózy přítomné v krvi hostitele (Oppendoes, 1987). V hmyzím vektoru trypanosomy obsahují velkou mitochondrii, která má plně vyvinutý dýchací řetězec (Hajduk et al., 1992).

U tohoto organismu byly nalezeny dvě formy NADH dehydrogenázy (Fang, Wang & Beattie, 2001). První z nich je citlivá na klasické inhibitory komplexu I, jako je rotenon, piericidin A nebo capsaicin (Fang, Wang & Beattie, 2001). Naproti tomu druhá je na rotenon necitlivá (Fang & Beattie, 2002). Tato necitlivost naznačuje, že se jedná o alternativní NADH dehydrogenázu, která není schopná přispívat ke vzniku protonového gradientu a tím k syntéze ATP. Jako kofaktor obsahuje nekovalentně vázaný FMN a je lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně. Je to enzym o celkové molekulární hmotnosti 65000 Da složený ze dvou podjednotek (2x 33000Da). Jako substrát využívá $\text{NADH} + \text{H}^+$, ze kterého přenáší elektrony na 2,6-dichlorfenolindofenol nebo ubichinon, ubichinon-0, ubichinon-1 a ubichinon-2. Produktem reakce je NAD^+ a redukovaný 2,6-dichlorofenol indofenol, respektive ubichinol. Alternativně ale může využívat také NADPH, z něhož přenáší

elektrony na ubichinon-1. Optimální pH pro aktivitu NADH: ubichinon oxidoreduktázy je 6, stabilní je při pH = 4,5. Její aktivitu lze inhibovat difenyl iodoniem (Fang & Beattie, 2002).

Rotenon citlivá NADH dehydrogenáza byla částečně purifikována. Pomocí imunoblottingu v ní bylo identifikováno několik podjednotek homologních komplexu I (51 kDa, PSST, TYKY, ND4, ND5, ND7). Celý komplex má molekulovou hmotnost asi 600 kDa a skládá se z minimálně 11 podjednotek. Podjednotky jsou kódované mitochondriálními i jadernými geny. Tato data svědčí o tom, že komplex I mitochondrie trypanosomy by mohl být podobný komplexu I bakterií, který se skládá z 13-14 podjednotek a má molekulovou hmotnost cca. 550 kDa (Fang, Wang & Beattie, 2001).

2.4.5.2.4. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*

Relativně málo je známo o komplexu I těchto intracelulárních parazitických protozoí způsobujících malárii a ostatních příslušníků kmene *Apicomplexa*. Jeho přítomnost u těchto organismů je nejasná.

Během asexuálního stádia životního cyklu v erythrocytech člověka postrádá jejich mitochondrie kristy, což indikuje, že jejich metabolická aktivita je limitována (Fry & Beesley, 1991; Krungkrai, 1995; Krungkrai et al., 1993; Langreth et al., 1978). Potřebná energie je tvořena anaerobní glykolýzou (Sherman, 1979). Předpokládá se však přítomnost elektron-transportního systému, který je nezbytný pro růst a přežití trofozoitů (Ginsburg et al., 1986; Krungkrai, 2000; Uyemura et al., 2000).

Katalytické podjednotky NADH dehydrogenázy byly demonstrovány a částečně purifikovány z *P. berghei*, parazita hlodavců, a *P. falciparum*, původce lidské malárie (Krungkrai et al., 2002). Dehydrogenáza se liší od savčího typu fyzikálně a kineticky. Enzym je z 90% citlivý na 2,5 μ M rotenon a na plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naftochinon, analog ubichinonu). Na plumbagin je mnohem citlivější než enzym savčí. Tento fakt by mohl být využit při vývoji antimalarik (Krungkrai et al., 2002).

2.4.5.2.5. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonády jsou pokládány za amitochondriální organismy, které tvoří ATP substrátovou fosforylací v hydrogenosomech (viz. 2.2.2.). Komplexy dýchacího řetězce nebyly u těchto prvoků dosud zjištěny. Sekvenování genomu *T. vaginalis* však ukázalo, že trichomonády mají geny s výraznou homologií ke dvěma

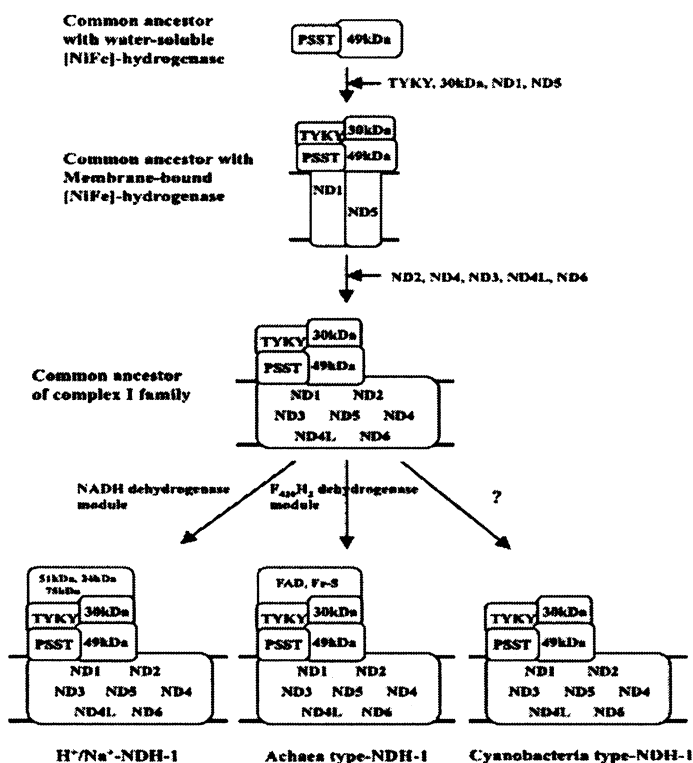
podjednotkám komplexu I o velikostech 51 kDa (NuoF, Tvh47) a 24 kDa (NuoE, Tvh22). Jejich buněčná lokalizace a funkce však není známá.

2.4.6. Evoluce komplexu I

Velká podobnost některých podjednotek komplexu I (45 kDa, 51 kDa, PSST, ND1 a ND5) a [NiFe] hydrogenázy vedla k domněnce, že pocházejí ze společného předka (Yano, 2002). "Molekulární evoluční teorie" (Friedrich & Weiss, 1997; Friedrich & Scheide, 2000) předpokládá, že komplex I je odvozen od enzymu podobného [NiFe] hydrogenáze. K tomuto původnímu enzymu se během evoluce připojily další funkční moduly (modul hydrogenázy, modul Na⁺/H⁺ antiporteru, modul NADH dehydrogenázy) a vytvořily tak komplexní enzym (Yano, 2002; Obr. 5).

Obr. 5. Evoluce komplexu I

Upravené podle Yana, 2002



3. Cíle diplomové práce

1. Zjistit buněčnou lokalizaci proteinů s homologií k podjednotkám mitochondriálního komplexu I o velikostech 51- a 24 kDa, kódovaných v jádře *T. vaginalis*, a zjistit místa odštěpení jejich adresových sekvencí.
2. Pomocí bioinformatických metod vytipovat další podjednotky komplexu I.
3. Vytipované geny zaklonovat a zjistit buněčnou lokalizaci jejich produktů.
4. Pokusit se identifikovat podjednotky komplexu I biochemickými metodami:
 - I. Blue Native Gel Electrophoresis
 - II. Afinitní chromatografie
 - III. Kapalinová chromatografie

4. Materiál a metody

4.1. Organismy

4.1.1. *Trichomonas vaginalis*

K transfekčním pokusům jsem používala *T. vaginalis* kmen T1 (izoloval J.-H. Tai, Taiwan). Buňky byly pěstovány v axenické kultuře v médiu TYM pH 6,2 (viz. 4.2.1) s agarem při 37°C. Kultury byly přeočkovány každých 24 hodin. Pro získání větších objemů kultury nutných k transfekcím a frakcionacím byly buňky postupným pasážováním převedeny do TYM média bez agaru, poté bylo 10 ml (1 zkumavka) naočkováno do 100 ml média bez agaru. Po 24 hodinách bylo 100 ml kultury naočkováno do 500ml (frakcionace) nebo 1000 ml (transfekce) TYM média bez agaru. Buňky byly zpracovávány po 24 hodinách kultivace.

4.1.2. *Escherichia coli*

Během pokusů jsem používala bakterie *E. coli* kmen XL1-Blue (Stratagene, <http://stratagene.com/products/showProduct.aspx?pid=549>) a kmen BL21- Gold (DE3) pLysS (<http://stratagene.com/products/showProduct.aspx?pid=551>).

4.2. Kultivační média

4.2.1. Médium TYM (Diamond 1957)

10 g kazeinový hydrolyzát; 5 g kvasničný autolyzát; 2,5 g maltóza; 0,1 kyselina askorbová; 0,5 g L-cystein hydrochlorid; 0,4 g KH₂PO₄; 0,4 g K₂HPO₄; (0,25 g agar); 500 µl zásobního roztoku citrátu železito – amonného; 450 ml destilovaná voda; pH 6,2. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 min), poté přidat 50 ml inaktivovaného (56°C, 30 min) koňského séra.

4.2.2. LB médium

2,5 g kvasničný autolyzát; 5 g kazeinový hydrolyzát; 5 g NaCl; (6 g agar); 500 ml destilovaná voda; pH 7. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 min).

4.2.3. SOC médium

2 g kazeinový hydrolyzát; 0.5 g kvasničný autolyzát; 0.05 g NaCl; 1 ml 250 mM KCl; destilovaná voda do 100 ml; pH = 7. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 min). Přidat 1.8 ml 20% roztoku glukózy sterilizované přes filtr a 0.5 ml sterilního roztoku 2M MgCl₂.

4.3. Zásobní roztoky

Antibiotika:

Amikacin (Bristol – Myers Squibb).....	25 mg/ml
Ampicilin (Sigma)	100 mg/ml
Geneticin G418 (Sigma).....	100 mg/ml
Penicilin (Biotika).....	100 000 U/ml
Kanamycin (Sigma).....	100 mg/ml
Chloramfenikol (Sigma).....	50 mg/ml
Tetracyklin (Sigma)	10 mg/ml

Blokovací roztok (imunobloting):

10% sušené mléko (Laktino, odtučněné); 0,25% Tween 20, PBS

Blokovací roztok - protilátka proti streptavidinovému tagu (imunobloting):

3% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma); 0.5% Tween; PBS

Blotovací pufr (imunobloting):

100 ml 10x konc. PBS; 200 ml metanol; 700 ml destilovaná voda

Blotovací roztok (imunofluorescence):

PBS; 0,25% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma); 0,25% želatina (Gelatin from porcine skin Type A, Sigma, # G2500)

Citrát železito – amonný:

1.14 g citrát železito – amonný (Lachema); 50 ml destilovaná voda

Fyziologický roztok:

9 g NaCl; destilovaná voda do 1000 ml

Inhibitory proteáz:

TLCK (Tosyl-lysyl-chlormetylketon) 25 mg/ml; Leupeptin 5 mg/ml

IPTG (Isopropyltiogalaktosid):

238 mg IPTG do 10 ml destilované vody (0,1 M, Sigma, #V3951)

PBS (Phosphate Buffer Saline):

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,53 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; destilovaná voda do 1000 ml;
pH 7,4

Pufry pro izolaci plasmidové DNA (MaxiPrep Merlin):

Merlin I: 50 mM glukóza; 25 mM TrisHCl; pH 8; 10 mM EDTA. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 min). Přidat RNázu A bez DNázové a proteázové aktivity (Fermentas, #EN0531) do finální koncentrace 10 µg/ml. Skladovat v chladničce.

Merlin II: 0,2M NaOH; 1% SDS

Merlin III: 3M acetát draselný+ pH 5,5. Rozpustit 61,35 g acetátu draselného v 37,5 ml kys. octové a doplnit destilovanou vodou do 500 ml.

MerlinMax binding buffer (Merlin IV): Rozpustit 133,68g guanidin hydrochloridu v 66,67 ml roztoku Merlin III a 40 ml destilované vody. Míchat v čisté nádobě za mírného zahřívání. pH 5,5.

MerlinMax Resin Slurry: Do 200 ml roztoku Merlin IV přidat 30 g Diatomaceous Earth (Sigma, # D5384). Uchovávat při RT.

Merlin V: 200 mM NaCl; 20 mM TrisHCl; 5 mM EDTA, 50% etanol; pH = 7.5

Pufry pro „Blue Native PAGE“:

3x Gelový pufr: 150 mM Bis–Tris (Sigma); 1,5 M aminokapronová kyselina (Sigma); pH=7.0

Katodový pufr: 15 mM Bis–Tris; 50 mM Tricin (Sigma)

Modrý katodový pufr: katodový pufr; 0.02% Serva Blue G (Feinbiochemica)

Anodový pufr: 50 mM Bis–Tris (pH=7.0)

AB mix: 48% akrylamid; 1.5% bisakrylamid

G: 10% amonium persulfát

Vzorkový pufr (MB2): 0.5 ml gelového pufru; 0.5 ml 2M aminokapronové kyseliny; 4µl 500 mM EDTA

Pufry pro afinitní chromatografii na Ni-NTA koloně za nativních podmínek:

Lyzační pufr: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH = 8.0

Eluční pufr: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 400 mM imodazol; pH = 8.0

Pufry pro chromatografii na monoS katexu a na hydroxyapatitu:

Pufr A: 10 mM KH₂PO₄; pH = 6.8

Pufr B: 10 mM KH₂PO₄; 1M NaCl; pH = 6.8

Pufr C: 500 mM KH₂PO₄; pH = 6.8

Pufy pro imunobloting proteinů na PVDF membránu:

5x zásobní vzorkový pufr: 0.5 M sacharóza; 15% SDS; 312.5 mM EDTA; destilovaná voda do 250 ml, pH=6.9

5x vzorkový pufr: 100 μ l merkaptotetanolu; 100 μ l 0.05% bromfenolové modře (BPB, Serva); 2 ml 5x zásobního vzorkového pufru

Towbin pufr: 25 mM Tris; 192 M glycin; 20% metanol; destilovaná voda do 1l

RNáza A:

10 mg/ml (Fermentas, #EN0531)

Roztoky pro stanovení množství proteinů dle Lowryho:

Roztok A: 2% Na₂CO₃ v 0,1 N NaOH.

Roztok B: 0,25g CuSO₄ + 0,5g vlnanu Na (nebo K/Na). Před smícháním obě látky rozpustit, roztoky slít, přidat menší pecičku NaOH a doplnit do 50 ml vodou. Skladovat v lednici.

Roztok C: Folin – ciocalteaufenolové reagens. Čerstvě ředit zásobní roztok 1:2 (folin : voda).

Roztok D: 1 ml roztoku B + 50 ml roztoku A, čerstvě naředit

Roztok barvy Coomasie Brilliant Blue:

50 mg Coomasie Brilliant Blue (Serva); 45 ml metanol; 45 ml destilovaná voda; 10 ml kyselina octová

Roztok barvy Ponceau:

0.5% Ponceau (Loba Feinchemie) v 1% kyselině octové

ST médium:

85.7 g sacharóza; 1.21 g TRIS; 37 mg KCl; destilovaná voda do 1000 ml; pH 7,2

X-gal:

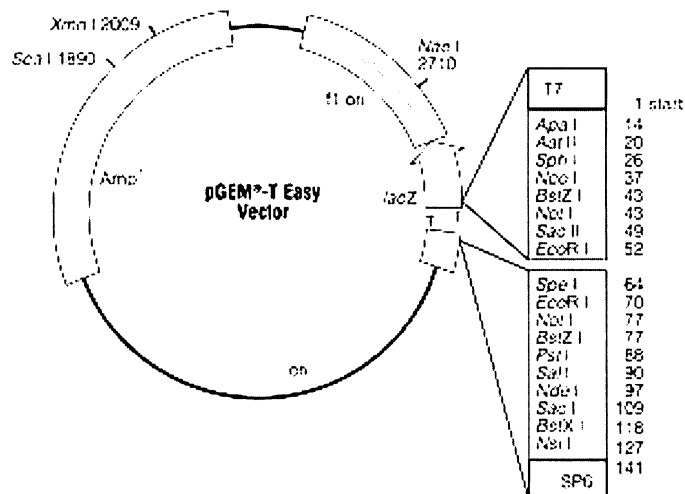
100 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (#V3941) do 2 ml N,N'- dimethylformamid

4.4. Použité plasmidy

4.4.1. pGEM T – Easy

PCR produkty byly ligovány do plasmidu pGEM T – Easy (Promega), který k ligaci využívá TA konců produkovaných *Tag polymerázou*.

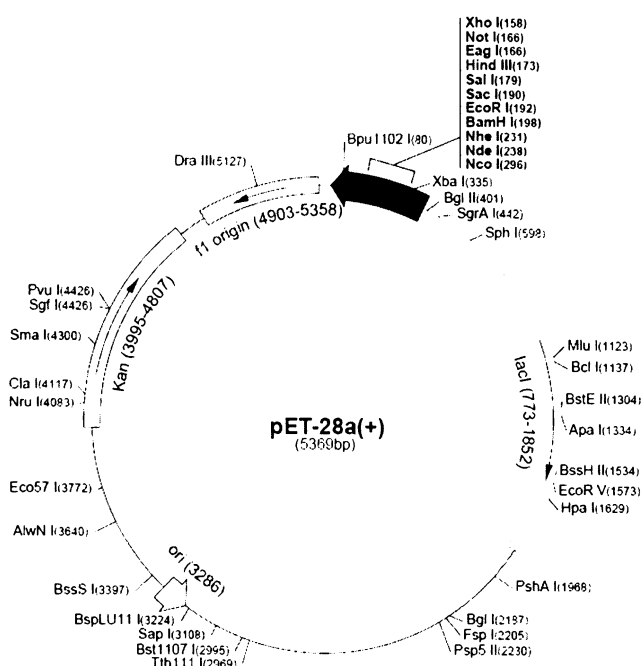
Obr. 5. Plasmid pGEM T – Easy



4.4.4. pET 28a

Pro expresi proteinů v bakteriích byl použit plasmid pET 28a (Novagen). Tento plasmid obsahuje N – koncový i C- koncový polyHis tag, díky kterému jsou rekombinantní proteiny zachyceny na Ni – NTA matrici.

Obr. 6. Plasmid pET 28a



4.4.3. pMasterNeo

K overexpresi proteinů značených hemaglutinovým nebo pentahistidinovým tagem v trichomonádách byl používán expresní plasmid pMasterNeo HAHA (poskytla Patricia J. Johnson, University of California, USA) a pMasterNeo 5x His (v naší laboratoři zkonstruoval Pavel Doležal).

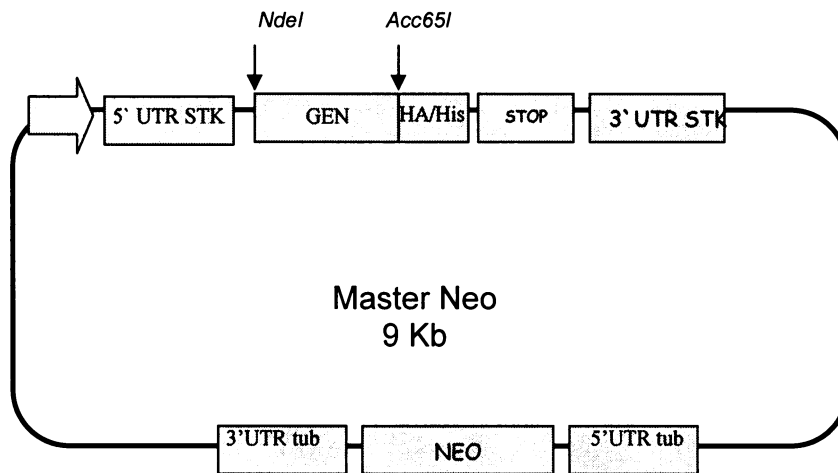
Obr. 6. Expresní vektor pMasterNeo HAHA tag

UTR STK – nepřekládaná regulační oblast genu pro sukcinát thiokinázu *T. vaginalis*

HA/His – hemaglutinový / pentahistidinový tag

NEO – gen pro rezistenci k neomycinu

UTR tub - nepřekládaná regulační oblast genu pro tubulin *T. vaginalis*



4.4.4. pTagVag

Dalším plasmidem použitým pro overexpresi proteinů v trichomonádách byl pTagVag, obsahující buď hemaglutinový (připravil Pavel Doležal), nebo streptavidinový tag (připravila Tamara Smutná, naše laboratoř).

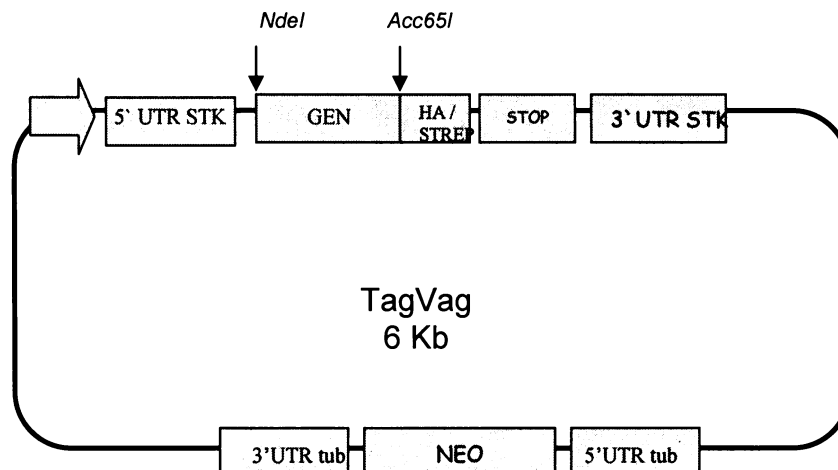
Obr. 7. Expresní vektor pTagVag

UTR STK – nepřekládaná regulační oblast genu pro sukcinát thiokinázu *T. vaginalis*

HA / STREP – hemaglutinový / streptavidinový tag

NEO – gen pro rezistenci k neomycinu

UTR tub - nepřekládaná regulační oblast genu pro tubulin *T. vaginalis*



4.5. Molekulárně biologické techniky

4.5.1. Izolace gDNA *T. vaginalis*

Genomová DNA byly izolovány z 20 ml kultury trichomonád kmene T1 použitím High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

4.5.2. Amplifikace DNA pomocí PCR

Tab. 3. Použité primery

Místa štěpení restričních endonukleáz jsou podtržené a značené trojúhelníčkem.

název	sekvence	teplota nasedání	restriční místo
Tvh47NdeIF	GCA ATT <u>CA</u> ▼T ATG CTT GCA GCA TAC	42°C	NdeI
Tvh47Acc65IR	CAT CGA <u>G</u> ▼GT ACC CTC AGC GAC GCA AGC	42 °C	Acc65I
Tvh22NdeIF	ATC <u>CA</u> ▼T ATG ATG CTT GCC TCA GTC AAC	60°C	NdeI
Tvh22Acc65IR	ATC <u>G</u> ▼GT ACC TGG GAG TGG TCT TGG TGG	60°C	Acc65I
TvhND4NdeIF	ATC <u>GCA</u> ▼ TAT GAT GGA AAC AAT CAC ACC CG	55°C	NdeI
TvhND4Acc65IR	ATC <u>GG</u> ▼G TAC CCA ATA AAA TAT TAT TTG	55°C	Acc65I
TvhND6NdeIF	ATC <u>GCA</u> ▼TAT GAT GAA CTT TTT CAA GAA TT	55°C	NdeI
TvhND6Acc65IR	ATC <u>GGG</u> ▼ TAC CGA ATT TCC TTG ATC CGT	55°C	Acc65I
TvhND1VspIF	ATC GAT▼ TAA TAT GAC TGA TAT CGA AAA CC	61°C	VspI
TvhND1BamHIR	ATC <u>GG</u> ▼G ATC CCA CTT CAT CAG ATT TG	61°C	BamHI
TvhND2VspIF	ATC GAT ▼TAA TAT GCC AGA TTT TAC AGC AT	61°C	VspI
TvhND2BamHIR	ATC <u>GGG</u> ▼ ATC CTG GCT GAA CAA GTT TTG	61°C	BamHI
TvhND6XhoIR	GAT <u>CC</u> ▼T CGA GTT ATT AGA ATT TCC TTG ATCC	58°C	XhoI

Podmínky PCR: 20µl reakce (chemikálie Fermentas)

2 µl 10 x PCR pufr bez MgSO₄

0,4 µl 10 mM dNTP Mix

2.5 µl MgSO₄

1 µl 10 µM primer F

1 µl 10 µM primer R

1 µl gDNA *T. vaginalis*

0,2 µl 5U/ µl *Taq* DNA polymeráza

0,2 µl 2,5U/ µl *Pfx* DNA polymeráza

doplnit sterilní vodou do 20 µl

Program PCR (cyclor PTC-200, MJ Research)

1. 94°C..5 min (denaturace)
 2. 94°C..0,5 min (denaturace)
 3. X°C ...0,5 min (nasednutí primerů)
 4. 72°C..1min (syntéza DNA)
kroky 2 – 4 opakovat 35 x
 5. 72°C..7 min
 6. 4°C....nastálo
- X = teplota nasedání primerů

Ověření bakterií na přítomnost vložených genů pomocí PCR:

Kolonie bakterií transformovaných plasmidy byly rozsuspendovány do 50 μ l sterilní destilované vody. 10 μ l bakteriální suspenze bylo denaturováno programem CRACK (cyclor PTC-200, MJ Research):

1. 96°C.... 5 min
2. 50°C.... 1,5 min
3. 96°C.... 1,5 min
4. 45°C.... 1min
5. 96°C.... 1 min
6. 40°C.... 1 min

Denaturovaná suspenze byla následně analyzována pomocí PCR za podmínek specifických pro vložený gen. Zbytek suspenze byl vyset na plotny s LB médiem a selekčním antibiotikem. Jedna vybraná pozitivní kolonie byla zamražena (-70°C) s 15% glycerolem a dále ověřena sekvenací.

4.5.3. DNA elektroforéza

Metoda horizontální DNA elektroforézy v 1% agarózovém gelu byla používána pro analýzu vzorků DNA (PCR, restrikční štěpení, izolace plazmidů). Pro vizualizaci DNA byl do agarózového gelu přidán ethidium bromid. Vzorky DNA byly před nanesením na gel smíchány s 6x koncentrovaným vzorkovým puřrem (Fermentas). Pro zjištění velikostí fragmentů byly používány standardy 1kb DNA Ladder a DNA Ladder Mix (Fermentas). Ethidium bromid navázaný na DNA byl vizualizován UV transluminátorem.

4.5.4. Extrakce DNA z gelu

Vzorek DNA byl z agarózového gelu vyříznut sterilním skalpelem pod UV transluminátorem. Poté byla DNA izolována použitím QIAquick Gel Extraction Kit (250) (Qiagen).

4.5.5. Ligace PCR produktů do plasmidu pGEM T – Easy

PCR produkty byly zaligovány do plasmidu pGEM T-Easy použitím pGEM T-Easy Cloning Kit (Promega).

4.5.6. Restrikce

0,5 µg DNA

1 µl pufru 10 x O⁺ / R⁺ nebo 2 µl pufr 10 x Tango Y⁺ (Fermentas)

0,5 µl restrikčního enzymu (10U/µl, Fermentas)

Restrikce probíhala přes noc v termostatu při 37°C.

4.5.7. Ligace DNA do expresních vektorů

Linearizované plasmidy a geny s odpovídajícími restrikčními místy na 3' a 5' koncích byly izolovány z gelu a ligovány v poměru 3 : 1 hodinu při 22°C. Poté byla *T4 DNA ligáza* inaktivována 10 minut při 65°C.

Reakční podmínky (chemikálie Fermentas):

5 – 10 µl směsi vektoru a plasmidu v poměru 3 : 1

2 µl 10 x ligačního pufru s ATP

0.5 µl *T4 DNA ligázy* (5U/µl)

4.5.8. Izolace plasmidové DNA pomocí metody “Maxiprep Merlin“

Maxiprep Merlin byl používán pro izolaci dostatečného množství rekombinantní plasmidové DNA nutné pro transformaci *T. vaginalis*.

Postup:

1. 1 litr bakteriální kultury centrifugoval při 3000 RPM/10 min, 4°C (K70 Janetzki). Bakteriální pelet rozsuspendovat v 10 ml Merlin I a přenést do sterilní 50 ml plastové zkumavky (Falkon).
2. Přidat 10 ml Merlin II a při pokojové teplotě (RT) 5 minut opatrně převracet.
3. Přidat 10 ml Merlin III, důkladně promíchat a směs inkubovat 30 min v ledové lázni.

4. Směs centrifugovat při 20000 RPM/ 20 minut/ 4°C (Beckman Optima L; rotor Ti 50.2).
5. Supernatant sterilně přenést do nové 50 ml zkumavky a přidat izopropanol v množství rovnající se 0,6ti násobku objemu supernatantu. Dobře promíchat. Zde se může postup přerušit a nechat precipitovat do druhého dne (4°C).
6. Centrifugovat při 9000 RPM/ 30 min/ 25°C (Hettich 32R). Odsát supernatant a pelet DNA usušit.
7. Rozpustit DNA v 2 ml HPLC vody.
8. Přidat 15 ml MerlinMax binding Buffer a 5 ml MerlinMax Resin Slurry. Suspenzi MerlinMax Resin Slurry je třeba několika minutovým třesením dobře rozmíchat.
9. Směs míchat při RT na horizontální třepačce 50 RPM / 20 minut.
10. Kolonku (Econo-Pac Disposable Chromatography columns, BioRad) upevnit do stojánku na stole a připojit k vývěvě. Do kolony nalít směs s plazmidovou DNA a vývěvou odsávat roztok, dokud se v kolonce nevytvoří pevné lůžko z křemičitanu s navázanou DNA. Poté DNA dvakrát promýt roztokem Merlin V (vývěva). Po druhém vymytí nechat běžet vývěvu ještě alespoň 5 minut.
11. Kolonku vyjmout z aparatury, uříznout jí vršek a vložit ji do sterilní 50 ml zkumavky (Falcon). Přidat 1,5 ml HPLC vody předeřáté na 80°C a centrifugovat při 9000 RPM/ 3min/ 25°C (Hettich 32R). Eluci DNA horkou vodou opakovat 4krát.
12. DNA rozpuštěnou v HPLC vodě precipitovat etanolem o objemu rovnajícím se 2,5 násobku objemu HPLC. V tomto kroku možno přerušit a nechat precipitovat do druhého dne (-20°C).
13. Centrifugovat při 9000 RPM/ 30 min/ 25°C (Hettich 32R). Pelet vysušit a rozsuspendovat v 0,5 – 0,75 ml HPLC vody.
14. Změřit optickou densitu při 206 nm a vypočítat koncentraci DNA.

4.5.9. Výpočet koncentrace DNA

K výpočtu koncentrace získané plasmidové DNA je třeba znát její optickou densitu při 260 nm. Pro transformaci *T. vaginalis* je potřeba 50 µg plasmidové DNA.

$$c = 50 \times A_{260} \times \text{zředění}$$

$$V = 50/c$$

c = koncentrace DNA (µg/µl)

A₂₆₀ = optická densita DNA při 260 nm

V = objem roztoku DNA, ve kterém je přesně 50µg DNA

4.5.10. Transformace buněk *E. coli*

4.5.10.1. Kmen XL-1-Blue

Kompetentní buňky *E. coli* kmene XL-1-Blue byly smíchány s ligačním produktem a ponechány v ledové lázni 30 min, následně byly transformovány teplotním šokem (42°C, 30s). Po přidání SOC média (37°C) byly inkubovány 1h na třepačce při 200 RPM a 37°C. Transformované buňky byly vysety na Petriho plotny s tuhým LB médiem s ampicilinem (100 µg/ml) nebo kanamycinem (25 µg/ml) a přes noc inkubovány v termostatu (37°C).

4.5.10.2. Kmen BL21

Kompetentní buňky *E. coli* kmene BL21 byly v elektroporačních kyvetách (2MM Gene Pulser Cuvette, BioRad) smíchány s 200 – 500 ng plasmidu a transformovány elektroporací na elektroporátoru GenePulser Xcell (BioRad) při 2.5 kV a 50 µF. Poté byly ihned rozsuspendedovány v 500 µl SOC média a inkubovány 1h při 220 RPM / 37 °C. 100 µl transformovaných buněk bylo vyseto na plotny s tuhým LB médiem se selekčním antibiotikem. Plotny byly přes noc inkubovány v termostatu při 37 °C.

4.5.11. Transformace *T. vaginalis*

1. V plastových 50 ml zkumavkách (Falcon) sterilně stočit 1 litr kultury trichomonád kmene T1 při 3000 RPM / 10 min / 4°C (Hettich 32R).
2. Zvážit pelet a na každý gram přidat 0,5 ml TYM 6,2 bez agaru. Rozsuspendovat.
3. Suspenzi 4 x sterilně přetlačit přes injekční jehlu 23G.
4. Do 0,4 cm kyvety (4MM Gene Pulser Cuvette, BioRad) na ledu napipetovat 300 μ l buněk a 50 μ g plasmidové DNA. Objem DNA musí být menší než 30 μ l.
5. Elektroporace při 350V a časové konstantě 175 ms nebo při 350 V a 975 μ F (elektroporátor GenePulser Xcell, BioRad).
6. Buňky ihned rozsuspendovat do vytemperovaného (37°C) média TYM 6,2 bez agaru s penicilinem (1000 U/ml) a amikacinem (250 U/ml) v 50 ml zkumavkách. Zkumavky inkubovat v termostatu (37°C).
7. Po 4 h přidat ke kultuře geneticin do koncentrace 100 μ g/ml k selekci pozitivních transformantů.
8. Po 24 hodinách přeočkovat kulturu do 10 ml zkumavky TYM 6,2 s agarem a geneticinem (100 μ g/ml). Do stejného média přeočkovat buňky každých 48h.

4.6. Biochemické techniky

4.6.1. Příprava buněčných frakcí *T. vaginalis*

Hydrogenosomy byly izolovány z trichomonád v logaritmické fázi růstu.

Postup:

1. Centrifugovat půl litru kultury trichomonád při 3000 RPM / 15 min / 4°C (K70 Janetzki).
2. Sediment buněk rozsuspendovat v chladném fyziologickém roztoku a přenést do 50 ml plastové zkumavky (Falcon). Promýt dvakrát chladným fyziologickým roztokem a jednou chladným ST médiem centrifugací při 3000 RPM/ 5 min/ 4°C (Hettich 32R).
3. Buňky rozsuspendovat v 10 ml ST média a přidat inhibitory proteáz do výsledné koncentrace 10 µg/ml leupeptin a 50 µg/ml TLCK.
4. Od této chvíle držet suspenzi na ledu a 5 minut odvzdušňovat mírným proudem dusíku.
5. Buňky homogenizovat na sonikátoru Vibra Cell při amplitudě 40 a délce pulzu 1 sekunda. Sonikaci opakovat 2-3krát, po každém opakování suspenzi promíchat a mikroskopicky zkontrolovat.
6. Z homogenátu odebrat 200 µl pro analýzu pomocí imunoblotingu.
7. Centrifugovat při 800g / 10 min/ 4°C (Hettich 32R). Sediment tvoří frakci jader a buněčných membrán.
8. Supernatant centrifugovat při 13500 RPM/ 30 min/ 4°C (Beckman Optima L, rotor Ti 50). Sediment představuje LGF (Large Granule Fraction), obsahující lysoosmy a hydrogenosomy.
9. Supernatant centrifugovat při 45000 RPM/ 45 min/ 4°C (Beckman Optima L, rotor Ti 50). V supernatantu je cytoplazma. Odebrat 200 µl na Western blot.
10. LGF dvakrát promýt v 1 ml ST média centrifugováním při 10000 RPM/ 3 min/ 4°C. Pokaždé centrifugaci opatně odsát bílé lysosomy.
11. Hnědé hydrogenosomy rozsuspendovat v 250 µl ST média a přidat inhibitory proteáz TLCK (50 µg/ml) a leupeptin (10 µg/ml).
12. Hydrogenosomy, cytoplazmu a homogenát udržovat na ledu, skladovat při -70°C.

4.6.2. SDS - PAGE

Proteiny byly separované podle molekulových hmotností na vertikálním 12% polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Před nanesením na elektroforézu (MiniProtean II, BioRad) byly vzorky smíchány s 1krát koncentrovaným SDS - PAGE vzorkovým pufrům, inkubovány 5min při 100°C a centrifugovány při 13500 RPM/ 5 min/ 25°C Relativní molekulové hmotnosti proteinů byly zjištěny porovnáním se standardem Sigma VII L. Proteiny byly vizualizované barvením gelu roztokem barvy Coomasie Brilliant Blue.

4.6.3. Blue native gel electrophoresis (BN - PAGE)

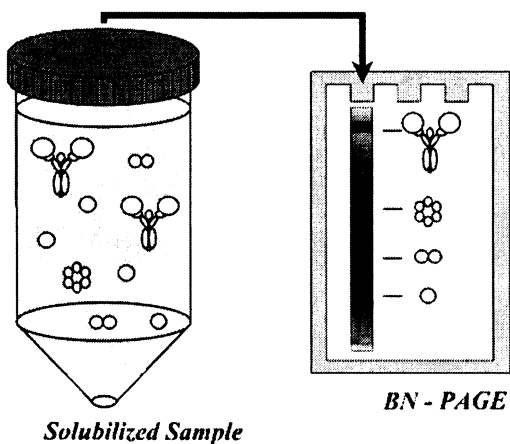
BN - PAGE slouží k izolaci enzymaticky aktivních proteinových komplexů, především proteinů mitochondriálního dýchacího řetězce. Izolace nativních komplexů je dosaženo použitím barvy Serva Blue G (SBG, analog barvy Coomasie Brilliant Blue G) a jemnějších detergentů, než je standardně používaný sodium dodecylsulfát (SDS). SBG dodává proteinům negativní náboj, díky kterému se mohou separovat v hustotním gradientovém gelu podle svých molekulových hmotností. Detergenty používané pro BN-PAGE musí splňovat několik požadavků: musí zrušit lipidové interakce membrány, ale nesmí porušit interakce mezi jednotlivými proteiny tvořícími komplexy, zároveň nesmí narušovat proces elektroforézy. Nejčastěji používané detergenty jsou Triton TX-100 (Merck), n-Dodecylmaltosid (Roche), octylglucosid (MP Biomedicals) a CHAPSO (Roche). Další důležitou látkou při BN-PAGE je kyselina aminokapronová, která pomáhá při solubilizaci proteinů (Eubel *et al.*, 2005).

Stabilita proteinových komplexů závisí na mnoha faktorech. Některé komplexy jsou citlivé na vysokou, nebo naopak velmi nízkou koncentraci solí. Stabilita jiných komplexů může být také narušena dlouhou expozicí barvě SBG. V tomto případě je vhodné nepřidávat SBG ke vzorkům, k udělení negativního náboje postačuje SBG přítomné v modrém katodovém pufru.

Komplexy separované pomocí BN-PAGE (první rozměr) lze rozdělit na jednotlivé podjednotky pomocí klasické SDS – PAGE (druhý rozměr). Lze je také přenést na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu nebo barvit barvou Coomasie nebo stříbřením (Eubel *et al.*, 2005).

Obr. 9. Princip BN – PAGE.

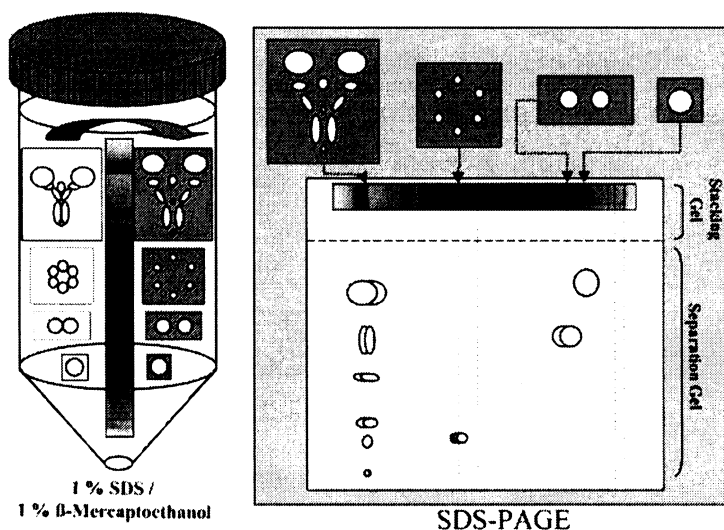
Po solubilizaci jsou proteinové komplexy separované podle molekulových hmotností.



Obr.10. Druhý rozměr BN – PAGE: SDS - PAGE

Požadovaná část gelu z BN – PAGE je vyříznuta a ponořena do denaturujícího roztoku (1% SDS, 1% merkaptoetanol), takže nativní proteinové komplexy se rozpadnou na jednotlivé podjednotky. Díky SDS a zbytkové SBG jsou proteiny negativně nabitě a mohou být rozděleny v závislosti na jejich molekulové hmotnosti.

Převzato z Eubela *et al.*, 2005



Solubilizace hydrogenosomů:

Hydrogenosomy byly rozsuspendované ve vzorkovém pufru a solubilizované různými detergenty 20 minut na ledu za občasného promíchání. Poté byly

centrifugovány 15 minut při 13000 RPM (4°C). K supernatantu bylo krátce před nanesením na gel přidáno 5% SBG tak, aby výsledný poměr detergent : SBG byl 1:1 až 10 : 1. K některým vzorkům nebylo 5% SBG přidáno, protože může přispět k nežádoucí disociaci proteinových komplexů.

Elektroforéza:

1. Sestavit aparaturu pro nalévání polyakrylamidových gelů (MiniProtean III, BioRad), tloušťka gelu 0.75 mm.
2. Nalít separační gradientový gel o hustotě 4% - 20%. Po polymerizaci separačního gelu nalít zaostřovací 4% gel.

	4% (2 ml)	20% (2 ml)
3 x GB	660 ul	660 ul
AB mix	160 ul	800 ul
H2O	1148 ul	136 ul
glycerol	-	400 ul
G	15 ul	2 ul
TEMED	1 ul	1 ul

3. Sestavit elektroforetickou aparaturu. Jamky naplnit modrým katodovým pufrém, elektroforetickou vanu anodovým pufrém.
4. Nanést vzorky.
5. Dělit proteiny při 60V, dokud čelo elektroforézy nedosáhne separačního gelu. Poté zvýšit napětí až na 300V (max. proud 15 mA). Poté, co čelo dosáhne poloviny gelu, vyměnit modrý katodový pufr za katodový pufr bez SBG.
6. Po ukončení elektroforézy lze gel barvit nebo blotovat na nitrocelulózu nebo PVDF membránu.

Druhý rozměr elektroforézy: SDS – PAGE:

1. Po identifikaci komplexu I (imunodetekce) příslušnou část polyakrylamidového gelu barveného Coomassie Brilliant Blue R vyříznout a na několik sekund ponořit do roztoku 1% merkaptoetanolu a 1% SDS.
2. Vyříznutý gel položit na sklo do místa, kam se nanáší zaostřovací (stacking) gel.
3. Sestavit aparaturu pro nalévání akrylamidových gelů a nalít separační gel. Převrstvit vodou.
4. Vylít vodu a nalít zaostřovací gel tak, aby obklopoval část gelu vyříznutou z BN PAGE.
5. Sestavit elektroforetickou aparaturu a dělit proteiny při 200 V.

4.6.4. Imunobloting analýza

Proteiny separované podle svých molekulových hmotností pomocí SDS - PAGE byly přeneseny na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu a poté detekovány protilátkou.

4.6.4.1. Blotování proteinů na nitrocelulózovou membránu

1. Nastříhat 6 kusů filtračního papíru Whatman a nitrocelulózovou membránu (Protran, Schleicher & Schuell) podle velikosti gelu. Filtrační papír a gel namočit do blotovacího pufru, membránu namočit do vody a do blotovacího pufru.
2. Sestavit blotovací aparaturu.
3. Blotovat při konstantním proudu 350 mA 1 hodinu na aparatuře Mini Trans Blot Cell (BioRad) nebo při konstantním proudu 1,5 mA x cm² gelu 2 hodiny.
4. Proteiny na membráně obarvit roztokem barvy Ponceau, vyznačit standardy a odbarvit membránu vodou.
5. Blokovat membránu v blokovacím roztoku 2 hodiny při RT nebo přes noc při 4°C.
6. Membránu inkubovat 1 hodinu s primární protilátkou v blokovacím roztoku na vertikální třepačce při RT.
7. Membránu promýt 3 x 10 minut v blokovacím roztoku na horizontální třepačce.
8. Inkubovat 1 hodinu se sekundární protilátkou v blokovacím roztoku na vertikální třepačce.
9. Membránu promýt 2 x 10 minut v blokovacím roztoku a 1 x 10 minut v PBS.
10. Proteiny detekovat barevnou reakcí alkalické fosfatázy.

4.6.4.2. Blotování proteinů na PVDF membránu

Přenos proteinů na Sequi – Blot PVDF membránu (BioRad) je využíván při jejich N – sekvenaci (Edman). Postup je podobný jako v případě blotování na nitrocelulózovou membránu, až na některé odlišnosti:

- PVDF membrána je hydrofobní, proto musí být napřed na pár sekund namočena do 100% metanolu a poté ekvilibrována v transferovém pufru (viz. Towbin pufr). Po navlhčení nesmí membrána uschnout.
- Gel (včetně zaostřovacího) je nutno nechat 24 – 72 hodin polymerovat, aby se odstranily volné radikály, které by blokovaly N – konce proteinů.
- Vzorky musí být před nanesením na elektroforézu smíchány s 5x vzorkovým puftrem bez močoviny a inkubovány 10 – 15 minut při 37°C.

- Po přenosu proteinů membránu 3 x 5 minut omýt v destilované vodě.
- Barvit 5 minut roztokem Coomasie Brilliant Blue R – 250 v 40% metanolu, odbarvovat 15 minut 50% metanolem.

4.6.4.3. Použité primární protilátky

- myší monoklonální protilátka proti hemaglutinovému tagu (poskytl Felix Bastida, LA, USA; 1:1000)
- myší monoklonální protilátka proti pentahistidinovému tagu (QiaGen; 1:1000)
- králičí polyklonální protilátka proti podjednotce komplexu I Tvh47 (Hrdý *et. al.*, 2004; 1:1000)
- králičí polyklonální protilátka proti jablečnému enzymu (Drmota *et al.*, 1996; 1:1000)
- králičí polyklonální protilátka proti feredoxinu (poskytla Patricia Johnson, LA, USA; 1:1000)
- myší monoklonální protilátka proti streptavidinovému tagu (IBA; 1:1000)
- myší protilátka proti pyruvát – feredoxin oxidoreduktáze (poskytl G. Brugerolle, Université Blaise – Pascal de Clermont – Ferrand, France; 1:500)

4.6.4.4. Použité sekundární protilátky

- kozí protilátka proti králičímu IgG spojená s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL) (1:2500)
- kozí protilátka proti myšímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL) (1:2500)
- kozí protilátka proti králičímu IgG značená fluorescenční barvou ALEXA FLUOR 594 (Molecular Probes, # A21207) (1:1000)
- oslí protilátka proti myšímu IgG značená fluorescenční barvou ALEXA FLUOR 488 (Molecular Probes, # A21202) (1:1000)

4.6.4.5. Substrát pro alkalickou fosfatázu

Fast 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/ Nitro Blue Tetrazolium Tablets, Sigma

4.6.5. Solubilizace hydrogenosomů

Pro afinitní chromatografii je nutné izolované hydrogenosomy solubilizovat 2% octylglucosidem, čímž se proteiny uvolní do tekuté fáze.

1. Hydrogenosomy rozsuspendovat v pufru s 10 mM imidazolem (chromatografie na Ni – NTA koloně) nebo 10 mM KH_2PO_4 (chromatografie na monoS katexu) a přidat octylglukosid (MP Biomedicals) do 2% finální koncentrace.
2. Solubilizovat 1 hodinu v Dounceově homogenizátoru na ledu za občasného promíchání.
3. Solubilizované organely centrifugovat při 45000 RPM / 20 min / 4°C (Beckman, rotor Ti – 50).
4. Ze supernatantu odebrat 100 μl na SDS – PAGE. Zbytek supernatantu nanést na Ni–NTA kolonu.

4.6.6. Měření NADH dehydrogenázové aktivity

NADH dehydrogenázová aktivita komplexu I byly měřena spektrofotometricky při 25°C jako změna absorbance 50 mM dichlorfenolindolfenolu (DCIP,) při 600 nm (molární extinkční koeficient DCIP = $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). K měření byl použit pufr obsahující 100 mM Tris a 50 mM KCl (pH = 8.0). Donorem elektronů bylo 337 mM NADH (133 g do 500 μl H_2O). Reakce byla startována enzymem. Jednotka enzymové aktivity (U) udává množství proteinu, které přemění 1 μmol substrátu za 1 minutu.

4.6.6.1. Výpočet aktivity komplexu I

$$\text{Specifická aktivita (S)} = \Delta E \cdot V / \epsilon \cdot v \cdot p$$

ΔE změna extinkce (EA)

V celkový objem v měřicí kyvetě

ϵ molární extinkční koeficient (pro DCIP = $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

v objem proteinového vzorku

p množství proteinu ve vzorku

$$\text{Celková aktivita (C)} = S \cdot V$$

V celkové množství proteinu (v celé frakci)

4.6.7. Stanovení množství proteinů podle Lowryho

1. Namíchat zásobní roztoky podle počtu měřených vzorků (každý vzorek měřit 2x).
2. Do kyvet napipetovat BSA (bovine serum albumine) ve známé koncentraci, které bude sloužit jako kalibrační křivka pro určení množství proteinů ve vzorku (Tab.4).

množství BSA (μg)
0
5
10
25
50
75

Tab. 4. Kalibrační křivka pro určení množství proteinů

3. Do dalších kyvet napipetovat vzorky. Je nutné znát přibližné množství proteinu ve vzorku, abychom získali hodnoty v rozmezí kalibrační křivky (hodně koncentrovaný vzorek = malý objem, málo koncentrovaný = velký objem).
4. Vzorek smíchat s vodou do finálního objemu 500 μl , přidat 2.5 ml roztoku D a nechat 15 min stát.
5. Přidat 250 μl roztoku C, protřepat a nechat 30 – 35 min stát.
6. Měřit absorbanci při OD = 670 nm.
7. Sestavit kalibrační křivku a odečíst množství proteinových vzorků.

4.6.8. Příprava rekombinantních proteinů

4.6.8.1. Indukce exprese proteinů v bakteriích *E. coli* BL21

1. Ověřit přítomnost plasmidu nesoucího odpovídající gen pomocí PCR.
2. Z osmi kolonií naočkovat 1 ml alikvóty LB média s kanamycinem (25 $\mu\text{g/ml}$), tetracyklinem (10 $\mu\text{g/ml}$) a chloramfenikolem (50 $\mu\text{g/ml}$). Inkubovat přes noc na třepačce při 37°C / 225 RPM.
3. Ráno napipetovat 50 μl bakteriální kultury do čerstvých 1 ml alikvótů LB média bez antibiotik. Kultury inkubovat na třepačce při 225 RPM / 37°C do hustoty OD₆₀₀ 0.6 (asi 3.5 hodiny; hustotu kultury průběžně kontrolovat měřením OD na spektrofotometru).
4. Z kultur odebrat 100 μl jako neindukovanou kontrolu.

5. K zbytku kultury přidat IPTG do finální koncentrace 0.5 mM. Inkubovat na třepačce při 225 RPM / 37°C / 4 hodiny. Po ukončení indukce dát kultury na led.
6. Indukované i neindukované vzorky rozvařit 5 minut ve vodní lázni se vzorkovým pufrům pro SDS – PAGE a analyzovat pomocí SDS – PAGE.

4.6.8.2. Purifikace rekombinantního proteinu

4.6.8.2.1. Příprava lyzátů buněk *E. coli*:

1. Bakteriální kulturu (1 litr, indukovaná viz. 4.6.8.1., inkubovaná na třepačce při 37°C 5 hodin a poté při 4°C přes noc bez míchání) centrifugovat při 6700 RPM / 10 minut / 4°C (centrifuga 32R Hettich).
2. Sediment zvážit a na každý gram přidat 5 ml lyzačního pufru. Rozsuspendovat.
3. Inkubovat 30 minut při pokojové teplotě na vertikální třepačce.
4. Suspenzi třikrát zmrazit v tekutém dusíku a rozmrazit.
5. Pokud je lyzát příliš viskózní, inkubovat 15 minut na ledu s RNázou (10 µg/ml) a DNázou (5 µg/ml).
6. Bakteriální lyzát centrifugovat při 13000 RPM / 30 minut / 4°C.

4.6.8.2.2. Chromatografie na Ni – NTA agaróze

K purifikaci proteinu značeného na N – konci 6 x histidinovým tagem byla použita chromatografie na Ni – NTA agaróze (QiaGen).

1. K supernatantu přidat 500 µl Ni – NTA agarózy a inkubovat 30 minut na vertikální třepačce při RT.
2. Směs nalít na kolonu (5 ml Bed–Volume Disposable Column, QiaGen) a nechat odkapat.
3. Sloupec z Ni – NTA agarózy promýt dvakrát 5 ml odmývacího pufru.
4. Eluovat proteiny 4 x 500 µl elučního pufru.
5. Ze všech frakcí odebrat vzorky a analyzovat pomocí SDS – PAGE a imunoblotingu.

4.7. Mikroskopické techniky - imunofluorescence

4.7.1. Silanizace podložních skel

1. Skla namočit na 20 – 30 minut (nebo přes noc) do 1 M HCl.
2. Oprat mírným proudem tekoucí vody 30 minut.
3. Dvakrát 5 minut smočit v destilované vodě.
4. Inkubovat v acetonu 30 min. Osušit.
5. Inkubovat v roztoku 2% 3-aminopropyltriethoxysilanu (Sigma) v acetonu 30 minut.
6. Oprat mírně tekoucí vodou 30 minut.
7. Oprat 2 x 5 minut v destilované vodě.
8. Zapéct ve sterilizátoru 60 minut při 100°C.

4.7.2. Příprava preparátů

1. Sestavit plnicí komůrku, která umožňuje adhezenci buněk k podložnímu sklu za anaerobních podmínek.
2. Komůrku naplnit kulturou *T. vaginalis*.
3. Inkubovat 15 minut v termostatu (37°C).
4. Rozebrat komůrku, buňky přichycené k podložnímu sklu nechat uschnout.
5. Fixovat 5 minut ve vychlazeném metanolu (-20°C) a 5 minut permeabilizovat ve vychlazeném acetonu (-20°C). Preparáty usušit.
6. Blokovat 1 hodinu v blokovacím roztoku ve vlhké tmavé komůrce při pokojové teplotě.
7. Inkubovat s primární protilátkou v komůrce 1 hodinu.
8. Preparáty promýt 3 x 5 minut v PBS.
9. Inkubovat se sekundární protilátkou 1 hodinu ve vlhké komůrce.
10. Promýt 3 x 5 minut v PBS.
11. Preparáty montovat do média Vectashield s Dapi (Vector laboratories).

5. Výsledky

5.1. Buněčná lokalizace podjednotek komplexu I Tvh47 a Tvh22

První známkou přítomnosti komplexu I v amitochondriálním organismu *T. vaginalis* byla částečná sekvence (cca. 7 kDa) odpovídající podjednotce katalytického modulu mitochondriálního komplexu I o velikosti 51 kDa (bakteriální homolog = NuoF) získaná z EST databáze dr. T. Martina Embleyho (School of Biology, The University of Newcastle upon Tyne, UK). Kompletní sekvence tohoto genu byla získána vyhledáváním v genomové knihovně *T. vaginalis* (Jan Tachezy, naše laboratoř). Tento gen, jehož proteinový produkt má relativní molekulovou hmotnost 47 kDa, byl pojmenován Tvh47.

Gen kódující další podjednotku katalytického modulu o relativní molekulové hmotnosti 22 kDa byl identifikován v genomovém projektu *T. vaginalis* (www.tigr.org). Tento gen je homologní s mitochondriální podjednotkou o velikosti 24 kDa (bakteriální homolog = NuoE) a byl pojmenován Tvh22.

Analýza proteinové sekvence podjednotek Tvh22 a Tvh47 programem PSORT II (obr. 11) ukázala, že na svých N-koncích obsahují adresové sekvence, sloužící k transportu proteinů kódovaných v jádře a syntetizovaných v cytoplasmě do hydrogenosomů (adresovým sekvencím je blíže věnován odstavec 5.2.6.3.). Porovnáním proteinových sekvencí s nejbližšími homology bylo zjištěno, že obsahují také funkční skupiny zodpovědné za koordinaci Fe-S center a vazbu NADH a FMN (obr. 12).

Přítomnost N-koncových adresových sekvencí ukazuje, že by obě podjednotky katalytického modulu komplexu I *T. vaginalis* mohly být lokalizovány v hydrogenosomech. K ověření buněčné lokalizace Tvh47 a Tvh22 byly v *T. vaginalis* produkovány rekombinantní Tvh47 a Tvh22 značené hemaglitunovým (HA3) tagem a jejich lokalizace byla následně detekována pomocí imunoblotingu v buněčných frakcích a v buňkách pomocí imunofluorescence.

Obr. 11. Porovnání N – koncové oblasti genů identifikovaných jako podjednotky komplexu I u *T. vaginalis*.

U podjednotek TvH22 a TvH47 byly zjištěny adresové sekvence pomocí programu PSORT II. Tyto adresové sekvence nebyly nalezeny u pravděpodobných membránových podjednotek TvHND1 - TvHND6 (viz. 5.2.1.).

Tvh22: MLASVNTSRF ▼ FARLNKKS.....
 Tvh47: MLAAYGHRF ▼ QTKFLDPKDR.....
 TvhND1: MTDIENQQPTDGQAPHKMPSS.....
 TvhND2 2: MPDFTAFSHERRNVRIVAFTPI.....
 TvhND4: METITPDIANGYPSTTTNDAKIP.....
 TvhND6: MNFFKNFIWNEVESSPFFTAS.....

Obr. 12. Porovnání genů pro TvH22 (A) a TvH47 (B) s mitochondriálním a bakteriálním homologem.

A. *Bos taurus* (CAA32848.1), *Yersinia pestis* (CAC91354.1) Cysteiny koordinující [2Fe–2S] centrum (CX₄CX_{35–36}CX₃C) jsou orámované.

B. *Bos taurus* (NP_777233.1), *Rickettsia prowazekii* (CAA14584.1) Glyciny NADH vazebného motivu (GXGGXGX₃G) jsou značené kroužky. FMN-vazebné místo (GA/MGA/Ryv/ICGEERA/SLL/IE/NSL/IEG) a cysteiny koordinující [4Fe–4S] centrum (CX₂CX₂CX_{38–40}C) jsou orámované.

Adresové sekvence jsou podtržené a místo odštěpení je značené šipkou.

A.

T. vaginalis					<u>MLASVNTSRF</u>	↓	↓	FARLNKKS	SVL	IQKDFKFS	DQ
B. taurus	<u>MFLSAALRAR</u>	<u>AAGLAAHWGK</u>	<u>HIRNLHKTAV</u>	<u>QNGAGGALFV</u>	<u>HRDTPENNPE</u>			TPFDFTPENY			
Y. pestis								MVNLAVNAAEPAA	MPDAFELSAE		
										*	.
T. vaginalis	SKVDAILAKY	PKENKRAATI	PLLHLGQREN	GGYLTGVLQ	AISKIVGVT	A		GRVHETACFY			
B. taurus	KRIEAIKVN	PEGHAAA	PVLDLAQRN	G-WLPISAMN	KVAEILQVPP			MRVYEVATFY			
Y. pestis	ERDAIEHEKH	HYEDARAASI	EALKIVQKQR	G-WVPDGAIH	AIADVLGIPA			SDVEGVATFY			
	..	::	.	**	:	*	::	*:::	*	:::	..
										:::	..
T. vaginalis	SMFRFQPPNN	HIVEV	KGLS	CYLTGSDNVK	EAIQKATGGT	FKEGKSPDGQ		FTLEEVE	CLG		
B. taurus	TMYNRKPVGK	YHIQV	CTTTP	CMLRNSDSIL	EAIQKKGLIK	VGET-TPDKL		FTLIEVE	CLG		
Y. pestis	SQIFRQPVGR	HVIRY	DSVV	CHITGYQGIQ	AALEKKLSIK	PGQT-TFDGR		FTLLPT	CLG		
	:	::*	..	::	⊠	⊠	:	:	*	***	⊠**
										:::	..
T. vaginalis	ANAPVMIL	DGVYYQNLTA	ETAKIIIECV	KAGKSVK							
B. taurus	AVNAPMVQI	NDNYEDLTP	KDIEEIIDEL	KAGKIPKPGP							
Y. pestis	NDRGPTMMI	DDTHSYLKP	EEIEKLLEQY	P							
	⊠	..*	:	::	⊠	⊠	:	:	*	***	⊠**

B.

T. vaginalis			MLAAYGHRF	QTKFLDPKDR	IFPNLFGDEG	ADLASAQKRG
B. taurus	MLAARRLLGG	SLPARVSVRF	SGDTTAPKKT	SFGSLKDEDR	IFTNLYGRHD	WRLKGAQSRG
R. prowazekii				MLKEEDK	IFTNLYGQQS	YDLKSSQKRG
Clustal Co				*. :*:	**.*:* * ..	* :*:**
T. vaginalis	DWNQTEELIK	KGKEFILNEV	KKSEIRGRGG	AGFSTGQKWS	FVPKPSG-IP	HYLCINADEG
B. taurus	DWYKTKEILL	KGPDWILGEV	KTSGLRGRGG	AGFPTGLKWS	FMNKPSDGRP	KYLVVNADEG
R. prowazekii	DWYNTKALID	KGRDFIIDEV	KKSGLRGRGG	AGFSTGMKWS	FMPKNSE-KP	CYLVVNADES
Clustal Co	** :*: ::	** :*:**	*.* :*****	***.* ** **	*: * * *	** :****.
T. vaginalis	EPGTCKDRQI	LTNEPHKLVE	GALLASYTIH	AHTAYVYVRG	EFRHEIACLQ	KAIDEAYAAG
B. taurus	EPGTCKDREI	IRHDPHKLVE	GCLVGGGRAMG	ARAAYIYIRG	EFYNEASNLQ	VAIREAYEAG
R. prowazekii	EPGTCKDRDI	LRFEPHKLIE	GCLIASFAIG	ANTCYIYIRG	EFYNEASNMQ	RALDEAYKEG
Clustal Co	*****:*	: :****:*	*.*... ::	*...*:***	** :* : :*	*: *** *
T. vaginalis	LIGKNNK-FG	WDFDMYIHSG	AGAYVCGEET	ALLNSIEGKA	GRPRFKPPYP	AAKGLFQKPT
B. taurus	LIGNACGSG	YDFDFVVRG	AGAYICGEET	ALIESIEGKQ	GKPRLKPPFP	ADGVVFGCPT
R. prowazekii	LIGNACGSG	FDCNIYLHRG	AGAYICGEET	ALLESLEGK	GMPRLKPPFP	AGFGLYGCPT
Clustal Co	***** *	:* :*: : *	*****	***:***	* **.***.*	* * : : **
T. vaginalis	IINNVEISS	VPTICKRGGD	WFSSIGIKGS	KGTKIYAIISG	HVNHPCVVEE	AMGIPIKDLI
B. taurus	TVANVETVAV	SPTICRRGGA	WFASFGRERN	SGTKLFNISG	HVNNPCTVEE	EMSVPLKELI
R. prowazekii	TINNVESIAV	VPTILRRGAS	WFAAIGKPNN	TGTVFCISG	HVNKPCNIEE	VMGVPLKELI
Clustal Co	: ***:::	*** :**.	**::**	.****: ***	***:** **	*.:*:***
T. vaginalis	NKYAGGVRGG	WDNLLCLIPG	GLSCPILTKE	QCETAVMGYN	ELSAMGSALG	TGAIIVMDKS
B. taurus	EKHAGGVTGG	WDNLLAVIPG	GSSTPLIPKS	VCETVLMDFD	ALIQAOQTGLG	TAAVIVMDRS
R. prowazekii	EKYAGGVRGG	WNNLKAIIPG	GASVPLLPKS	LCE-VEMDFD	SLRTVGSGLG	TGGIIVMDKS
Clustal Co	:*:* ** **	*:** .***	* * *::*.	** . *::	* :.**	*..****:*
T. vaginalis	TNLYEAFRRV	SHFYMHESCG	CCGFCREGTA	KLSDIMDKFA	EGKATKHDLL	MLKKVAYQTS
B. taurus	TDIVKAIARL	IEFYKHESCG	QCTFCREGVD	WMNKVMARFV	RGDARPAEID	SLCEISKQIE
R. prowazekii	TDIIYAIARL	SKFYMHESCG	QCTFCREGTG	WMWRVMMRLV	NGNAKKNEID	TLLNVTKEIE
Clustal Co	*:: *:* :	.** ****	** ****.	: :* :.	.*. * : :	* : : : .
T. vaginalis	-NCITCALAGA	SSDPIKGLLK	QFRPELEKAC	VAE		
B. taurus	GHTICALGDG	AAWPVQGLIR	HFRPELEERM	QQFAQQHQAR	QAAF	
R. prowazekii	GHTICALGDA	AAWPIQGLIR	HFRDEIEQRI	KSFGIA		
Clustal Co	: ***... :	:* :***:	** *:*:			

I

5.1.1. Příprava plasmidů pro expresi genů TVh22 a Tvh47

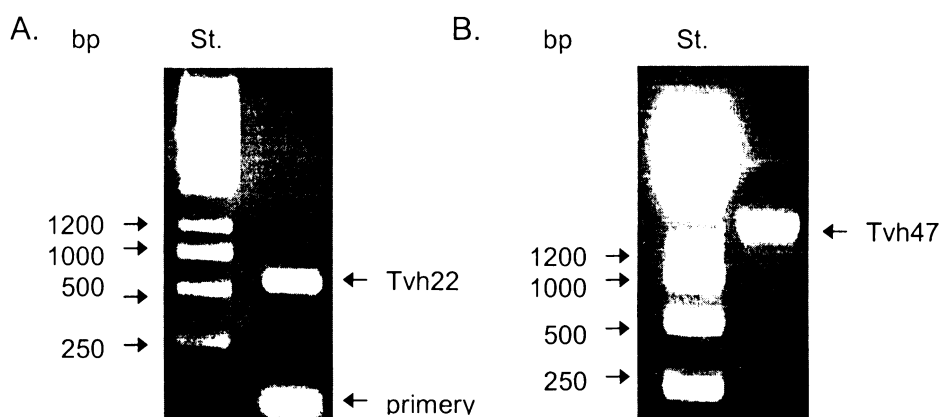
v *T. vaginalis*

Gen Tvh22 byl amplifikován z gDNA *T. vaginalis* pomocí PCR za využití primerů Tvh22NdeI/F a Tvh22Acc65I/R (viz. Tab. 3) při teplotě nasedání primerů 60°C (Obr. 13A). Gen Tvh47 byl amplifikován stejným postupem za použití primerů Tvh47NdeI/F a Tvh47Acc65I/R při teplotě nasedání primerů 42°C (obr. 13B).

Obr. 13. Amplifikace genů Tvh22 (A) a Tvh47 (B) z gDNA.

Velikost amplifikovaných genů je 606 bp (Tvh22) a 1287 bp (Tvh47).

St.–standard DNA



PCR produkty byly zaligovány do plasmidu pGEM T – Easy a ligačním produktem byly transformovány buňky *E. coli* kmene XL-1-Blue. Několik kolonií bylo ověřeno na přítomnost plasmidu postupem popsaným v kapitole 4.5.2.. Z jedné z pozitivních kolonií byla izolována plasmidová DNA použitím QIAprep Spin Miniprep kit (250) (Qiagen). Z izolovaných plasmidů byly inserty vyštěpeny restričními enzymy *NdeI* a *Acc65I*. Stejnými enzymy byl štěpen plasmid MasterNeo, obsahující hemaglutinový tag. Inserty byly zaligovány do štěpeného plasmidu a plasmidy MasterNeo-Tvh22-HA3 a MasterNeo-Tvh47-HA3 byly transformovány buňky XL-1-Blue. Kolonie byly ověřeny PCR a jedna z pozitivních také sekvenací (obr. 14).

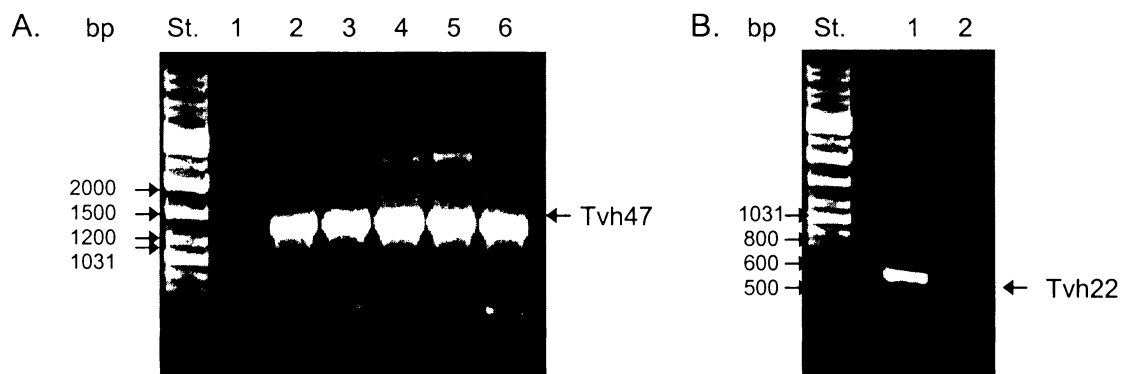
Obr. 14. Ověření zaklonování insertů pomocí PCR.

Velikost PCR produktů o velikostech cca. 1300 a 600bp odpovídá podjednotkám Tvh47 (A) a Tvh22 (B).

(A) 1 – 6: kolonie bakterií transformovaných plasmidem MasterNeo-Tvh47-HA3

(B) 1 – 2: kolonie bakterií transformovaných plasmidem MasterNeo-Tvh22-HA3

St. – standard DNA



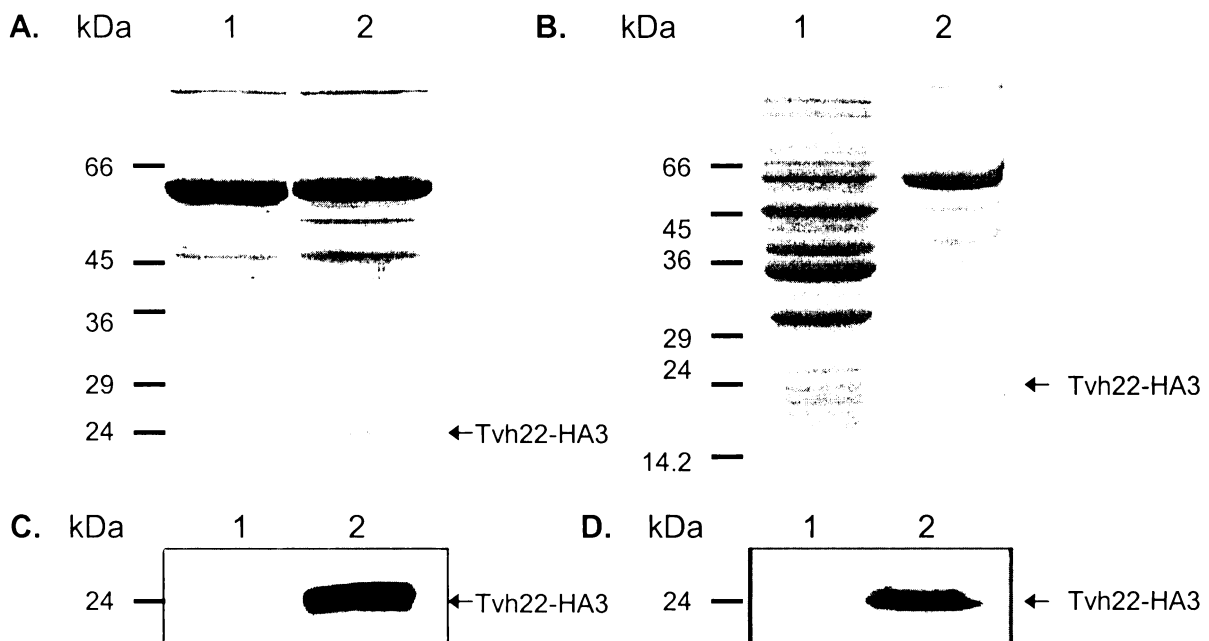
5.1.2. Detekce rekombinantních proteinů Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3 značených hemaglutinovým tagem v buněčných frakcích

Trichomonády kmene T1 byly v tetraplikátech transformovány plasmidy MasterNeo-Tvh22-HA3 a MasterNeo-Tvh47-HA3. Po selekci transformantů (cca. 5 dní) byly trichomonády rozděleny na jednotlivé buněčné frakce (homogenát, cytoplasmu a hydrogenosomy) a analyzovány imunoblotingem. Pomocí imunoblotingu se mi podařilo prokázat, že oba rekombinantní proteiny byly produkovány v trichomonádách, přičemž většina obou proteinů byla zjištěna v hydrogenosomální buněčné frakci (obr.15, obr. 16)

Obr. 15. Expres podjednotky Tvh22 v *Trichomonas vaginalis*.

(A, C): Porovnání hydrogenosomální frakce rodičovského kmene T1 (1) a trichomonád produkujících rekombinantní protein Tvh22-HA3 (2) pomocí SDS-PAGE (A) a imunoblotingu (C). Protein o očekávané relativní molekulové hmotnosti byl detekován pomocí protilátky proti HA3 tagu výhradně v transformovaných buňkách.

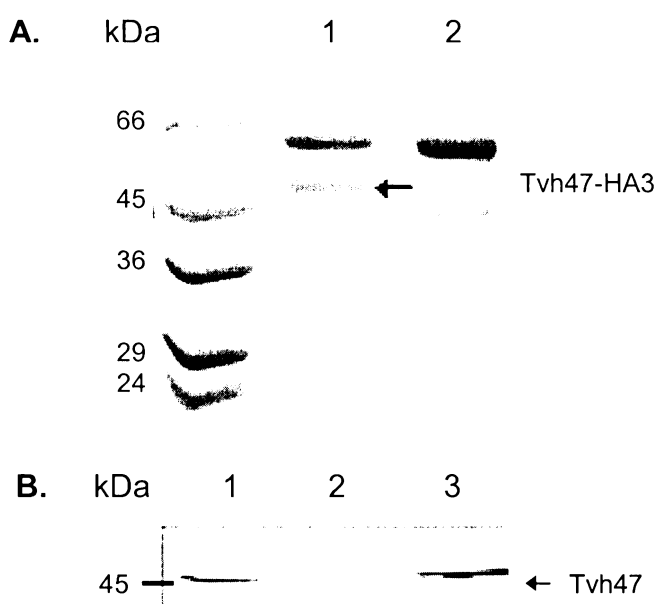
(B, D): Porovnání buněčných frakcí transformovaných buněk pomocí SDS-PAGE (B) a imunoblotingu s protilátkou proti HA3 tagu (D) ukázalo specifickou lokalizaci Tvh22-HA3 v hydrogenosomální frakci (2), zatímco v cytoplasmě bylo zjištěno jen nepatrné množství rekombinantního proteinu (1D).



Obr. 16. Exprese podjednotky Tvh47 v *Trichomonas vaginalis*.

(A): Porovnání hydrogenosomální frakce trichomonád produkujících rekombinantní podjednotku Tvh47-HA3 (1) a trichomonád rodičovského kmene T1 (2) pomocí SDS-PAGE.

(B): Porovnání buněčných frakcí trichomonád rodičovského kmene T1 pomocí imunoblotingu protilátkou proti Tvh47 ukázalo přítomnost této podjednotky ve frakci buněčného homogenátu (1) a hydrogenosomální frakci (3). V cytoplasmě (2) nebyl protein detekován.



5.1.3. Detekce Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3 v buňkách *T. vaginalis* pomocí imunofluorescence

Pomocí imunofluorescence byla potvrzena přítomnost Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3 v hydrogenosomech *Trichomonas vaginalis* (obr. 17, obr. 18). Signál pro hemaglutinový tag, kterým jsou obě podjednotky značeny, byl patrný v drobných kulovitých organelách, uspořádaných podél axostylu a costy. Tento signál kolokalizoval se signálem pro jablečný enzym, který je typickým hydrogenosomálním proteinem (Drmotá *et al.*, 1996).

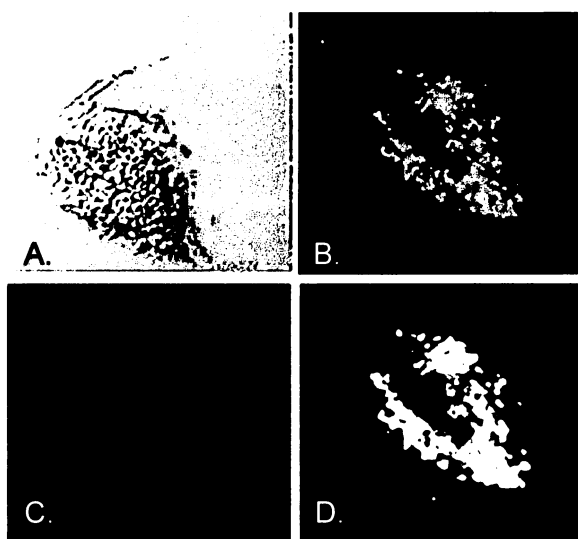
Obr. 17. Lokalizace podjednotky Tvh22-HA3 v hydrogenosomech *T. vaginalis* pomocí imunofluorescence.

A. Diferenciální interferenciální kontrast (DIC).

B. Podjednotka Tvh22-HA3 detekovaná myší monoklonální protilátkou proti hemaglutinovému tagu a následně oslí sekundární protilátkou proti myším proteinům značenou fluorescenční barvou ALEXA Fluor 488.

C. Jablečný enzym detekovaný specifickou králičí polyklonální protilátkou a kozí sekundární protilátkou proti králičím proteinům značenou fluorescenční barvou ALEXA Fluor 594.

D. Složený obraz; modře jádro značené DAPI.



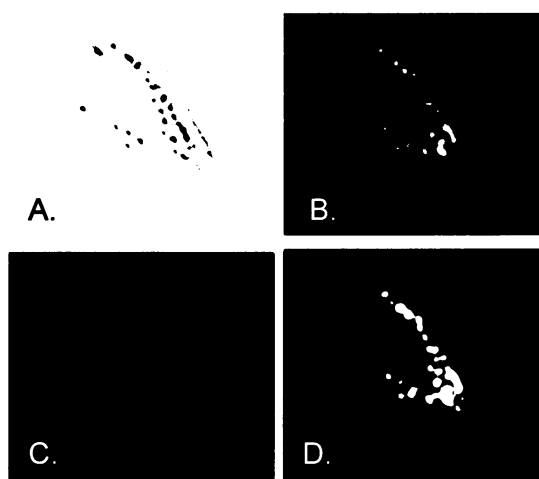
Obr. 18. Lokalizace podjednotky Tvh47-HA3 v hydrogenosomech *T. vaginalis* pomocí imunofluorescence.

A. Diferenciální interferenciální kontrast (DIC).

B. Podjednotka Tvh47-HA3 detekovaná myší monoklonální protilátkou proti HA3 tagu a oslí sekundární protilátkou proti myším proteinům značenou fluorescenční barvou ALEXA Fluor 488.

C. Jablečný enzym detekovaný specifickou králičí polyklonální protilátkou a kozí sekundární protilátkou proti králičím proteinům značenou fluorescenční barvou ALEXA Fluor 594.

D. Složený obraz; modře jádro značené DAPI.



5.2. Vyhledávání dalších podjednotek komplexu I u *T. vaginalis*

U většiny organismů je komplex I tvořen 14 až 43 podjednotkami (viz. 2.4.). Proto nás zajímalo, zda se kromě Tvh22 a Tvh47 nějaké další podjednotky nalézají i u trichomonád.

5.2.1. Bioinformatický přístup

První metodou, kterou jsem využila při hledání dalších podjednotek komplexu I u trichomonád, je hledání v databázi *Trichomonas vaginalis* TIGR (The Institute for Genomic Research), kde probíhá kompletní sekvenace genomu *T. vaginalis*. Databáze po zadání klíčového slova NADH dehydrogenase uvedla jako možné podjednotky několik různých genů (Tab. 5).

Tab.5. Geny potenciálních podjednotek komplexu I vyhledané v databázi TIGR.

V databázi bylo nalezeno 6 kompletních genů a 3 nekompletní geny.

jméno	přístupové číslo (TIGR)	bp	AK
respiratory-chain NADH dehydrogenase 24 kDa subunit family protein (Tvh22)	90175.m00111	66	202
Respiratory-chain NADH dehydrogenase 51 kDa subunit family protein (Tvh47)	86576.m00242	1278	426
nadh-quinone oxidoreductase chain f (Tvh47), nekompletní ORF	61611.m00063	720	239
NADH dehydrogenase subunit 1	75700.m00007	1659	552
NADH dehydrogenase subunit 2	55430.m00016	1443	780
NADH2 dehydrogenase subunit 2, nekompletní ORF	63093.m00025	1011	336
NADH dehydrogenase subunit 4	42622.m00193	1446	481
NADH2 dehydrogenase subunit 4, nekompletní ORF	72538.m00021	1332	443
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit 6	43286.m00184	1134	377

Hypotetické produkty těchto genů jsem použila pro vyhledávání nejbližších homologů pomocí programu BLAST (blastp, www.ncbi.nih.gov) (obr. 19). Zároveň jsem vyhledávala v databázi *T. vaginalis* (TIGR) homology podjednotek komplexu I s využitím programu blastp. Při zadání mitochondriálních podjednotek komplexu I (*Bos taurus*) jako „query“ jsem získala geny pro Tvh22 a Tvh47 katalytického modulu komplexu I, homology membránové části a spojovacího segmentu nebyly tímto způsobem nalezeny.

Pro další pokusy jsem používala čtyři geny s částečnou homologií k mitochondriálním podjednotkám membránové části komplexu ND1, ND2, ND4, ND6, nalezené v databázi TIGR při zadání slova NADH dehydrogenase. Tyto podjednotky jsem pojmenovala TvhND1, TvhND2, TvhND4 a TvhND6 (Tab. 6).

Tab. 6. Známé a vytipované geny podjednotek komplexu I u *T. vaginalis*.

jméno	přístupové číslo (TIGR)	bp	molekulová hmotnost (kDa)
Tvh22	90175.m00111	606	22
Tvh47	86576.m00242	1287	47
TvhND1	75700.m00007	1659	64
TvhND2	55430.m00016	1440	54
TvhND4	42622.m00193	1446	56
TvhND6	43286.m00184	1134	43

Obr.19. Porovnání podjednotek komplexu I anotovaných v databázi *T. vaginalis* TIGR s nejbližšími homology, nalezenými v databázi NCBI pomocí programu blastp.

A. Porovnání sekvence podjednotky TvhND1 (75700.m00007) s mitochondriálním homologem *Dalbulus maidis* (AAC05761.1).

```

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  MTDIENQQPT DGQAPHKMPS SNDYLSNEYF SSDNEPFYNG DPQSPQYLNN EYYPQTPQT

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  QSTNKPIEPT SIHDLYARSN FNEDISAWNT IMNEPSEHSD FWITPEALTN FSQNTATQLKK

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  HNSFLWAIPF ILNCLALIGL FNFIRYHLD YMKYGINVAV PTIICYWISL YL ICPIGLVQS
                                                *      :: :...

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  LF--IwVLFp FYVNCVEFDL G----- --LLFFLSCM SMGVYg-LMI CGWSSNSIYS
        * * * * * ::* : . : *      EYIFVWLTFL VLGLFFYLIT SGRAEYDIFM
                                                : : * : : : * : : * : * : * : * :

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  MLGCIRSVSQ AISYEVSLSM ILLGFFLLID SYSFMDYFFY QKFWWFSFLS LPLCFCWLSC
        ARLIRRKVYQ TGNyIFLI FI VLVIMCCAIC FPVYDSWTF NSVNWiyQAY LTISFYNIvC
        * * * : . * . : : * : : *      : . : : : . . * : * : . * : *

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  CMAETNRTPF DFSE----- ----GESELV SGFNVEYGG- ----GYAL LFISEYLSII
        VFGNCTYMSS SYMAAKWYLT GEKIGAKDVS KGLRTGFIDN IGVACKMSYL LPILEFVNAI
        : : . . : :      * : : * * : : .      * * * * : : *

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  FVCLGSCIIF FGSDFN---- -----
        SRySPQLTVY HIKDKYPLFA KHycAVCGPI VRLFKKLAKF EMKLLGYPQR RAMTYCAIYG
        . : : . *

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  -----YD KLMFLAWKCY LPISLNyVFM FL----- ----FLKS LCFYHFFL
        LNDALALFYV FAVYYSFRci TRGFLETvFV LFGELPEKAN NIDPDLFDTL KEMFETSLKA
        *      : : : : *      * : * : : :      * .      : : *

Dalbulus
Trichomonas
Clustal Co  RNDTDIKSD EV

```

B. Porovnání sekvence podjednotky TvhND2 (55430.m00016) s bakteriálním homologem *Bartonella bacilliformis* (ZP_00947229.1) a mitochondriálními homology *Crithidia oncopelti* (CAA39492.1) a *Naegleria gruberi* (AAG17811.1).

Trichomonas	MPDFTAFSH	ERRNVRIVAF	TPQEFPTGYG	P-----L	AFILAILPKH	LDRLEEILKQ
Naegleria	MLLNFFLLP	ENYLLFSIFF	IFIYLIFFSF	SAEKKFPKKN	KFTEYIVKLI	LINFFFLTLS
Crithidia	MFLFFFMLFF	LFGFFLGTFF	LGRHLLSFWL	S-----I	LMTVFLVMVT	MFSFFCISVC
Bartonella	MTTREAMLIL	LVLLPFGGSF	IIGFFRSTAK	NNE-----A	WFAGAIALFS	LLFTIMLYPT
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	PTNCKYILT	CHYTHELLYP	RSAK-----	--SKSGLTFK	DMLKHYNITV	YLNHGHTRPK
Naegleria	FFSYNYGVRD	IFFRDLSNG	IQ-----	---LINIILV	FLFFTCVPFL	LNKYSLSSE
Crithidia	LYGYCYDFC	LILMLDLCFI	FMSFYCNGFY	LFILFLIDLV	FCFILFYAFY	YMYDDLMLKR
Bartonella	IRGNVVRD	ISWLPWGVGD	LTLR-MDGLS	WLFCLLITGI	GLLVVVYARY	YMPADPVPR
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	IEPVHYGGVM	ELTARATKVS	SDLTILTLDN	NRINYKSIHQ	YSEYNAIISH	PVPQHLQVAN
Naegleria	FTILILLCLL	SLNLLVITVN	LISFYLLLEF	QSIKCYILAS	YGKKNKYSFE	AGLKYFILGS
Crithidia	FFNIFWVFL	CMNFFILSYD	YLTAYCGWEL	LGLFSFFLIS	YFWYRFFALK	FGFKSFFISK
Bartonella	FFSFFLAFMG	SMTGIVLSGN	LVFLVIFWEL	TSIFSFLIG	YWYHNASARD	GARMALTITG
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	TKDITFPINV	ISFD-----	-----	-----PSQ	TKVFNVSQDA	TGTLTFKEYI
Naegleria	FSSVLLLFGI	ALFYGFTG--	-----	---IFYEDL	NLFFLNLSNI	DSN-----
Crithidia	IGDVLLLSF	VMTFIISTGYG	MINFYFVN-F	LCVDFYFTAF	MLFLLIMCAF	TKSTQFGLHI
Bartonella	FGGFALLVGV	LLIGHIVGSF	DLDKVLQSGD	LIRSSPLYNL	VLICVLLGGL	TKSAQFPFHF
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	DEENSVALYQ	MNATFESGIH	TIYITGD LTD	NVTFVAVNCES	GPFY-----	-----
Naegleria	-----I	YLNSIFNFSI	ALMLVGLLFK	LYSFPFHFWV	SDIY-----	-----
Crithidia	WLPDAMEGPI	PVSALIHAAAT	LVVCGILLVS	FFFWCDFDWL	AYFYPLIGWS	SLILVMMSLC
Bartonella	WLPNAMAAPT	PVSSYLHSAT	MVKAGLFLLI	RLWPVLSGTE	SWFFLVGFAG	LTTLLLGSYF
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	-----ESQRS	LIDPKTGMVG	FPMFILFGI	ITIFIWVPPF	YFNDTASYII	GSGQAVNWWL
Naegleria	-----QGSTF	VTFFFALVP	FLSIFYIF--	--MKLYFYIY	FFFYENFIIF	LFQCSVGSML
Crithidia	VFYNFDAKRF	VAFSTICQIS	FMSFCLC--	--LDLYVGCL	FFCYHMFYKA	TLFIVLGVWI
Bartonella	SMFQHDLKGL	LAYSTISHLG	LITLLSLGS	P-LACVAAIF	HMANHATFKA	SLFMAAG-II
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	IIFCGPIVVG	RALSKLEIWI	KIFLTIWVW	EICLPITLYN	FEGNLAMFFI	WG---YVTKG
Naegleria	IGSIGAIQQ-	KKFRRLMAYS	SITG-----	-----	-TGYYLMVFL	FPDLALVKNV
Crithidia	HLFFGLQDV-	RCYFFIYFCG	CVLARMLLVF	ALLNSCSSLWF	LCGFYCKDLL	LCTLMLVSHF
Bartonella	DHETGTRDM-	RKLTGLFHVM	PITGTLALVA	SAAMAG-VPL	LNGFLSKEMF	FAEAVETHME
Clustal Co	*	:	:	:	*	:
Trichomonas	KYVKDVFSYV	CGFVAFTGFI	SDIVFAGLVY	-----	-----	-----LS
Naegleria	FFFIFV--YI	VNVLAI FVSF	SNLSFIRYKY	NIER-----	-----	-----FS
Crithidia	FILEFL--FV	CIFFIFFTVI	YNYFLLFFLC	FVFKCFCLAD	C-----LFL	DFECCLIYC
Bartonella	SWLDWIAPYI	ATLASLFSVT	YSIRFIHGWF	FGSKPTDLPK	TPHEPPHMR	FPMEFLVVIC
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	ILNIGWSYH	LDLCLVIGT	LGFGYWFCNL	YVGEIAYYGV	WVGSFPYFIF	PVLAIIIYAV
Naegleria	LLADLLKYNR	LFAIMIVLFF	FGVAGLPPFP	SFLAKLYLLF	NLFNNGFYFF	IFLIIVTTVL
Crithidia	FLGLYMCFIL	IFFVIDFLYI	FVFSYCMFW	SFYLYYFNFF	DIASFTVFMV	ISLAFIYYGC
Bartonella	LAVGIFPHLT	IGSILDNAVW	AVLG--SATP	SYSLAVWHGL	NTPLIMSFMA	LFGGILLYIL
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Trichomonas	SAFFYYRKP	QPDVSSSDQ	EIKDGNTKL	VQPLLMYILFFNI	LLILKPSLIL	IPLEYFLI
Naegleria	SFYYLRISK	VILYNKNNKW	FFINNISYSSAL			
Crithidia	VLFYFFNVDC	IMLFWRIFLI	ICVTFMFGL	FSCWYFACFFIYL	LLFVWNVFIY	FRYNLKYC
Bartonella	GSRYFLSCDE	GPPFFRYFKG	QRIFEQILVI	ISWKWARTAE	SFLSTRRLQA	QLHWVLLVCF
Clustal Co	:	:	:	:	:	:
Crithidia	LFFCLLLIL	YI				
Bartonella	VFVGLLLWRD	GWISAGSLPI	FPLEVSMFAI	WVVGVCALL	VAWKAKFHRF	TSLMLLGGAG

D. Porovnání sekvence podjednotky TvhND6 (43286.m00184) s mitochondriálními homology *Dirofilaria immitis* (CAD61190.1), *Yarrowia lipolytica* (CAC28115.2) a bakteriálním Na/H antiporterem *Methanosarcina barkeri* (AAZ69481.1).

```

Trichomonas          MNEFFKN FIWNEVE--- ----SSPFFT
Dirofilaria          MCLF FFVWLSL FFTPFLFFVF FMFFILFGFF DFSWSGLFFF
Yarrowia             MLILAIISLI TFVSMKLSL NRAIIRLINI YLILVLVLDL FLYLLFLNNQ TYTVMGELLI
M. barkeri           MSALLQ LLFLIFS--- -VKILGEAAE
Clustal Co          . : ::: .

Trichomonas          ASWEPYRLKK LLVIFSIGIS CFVS----- ----- -FTALFISST ISLPIHNEGT
Dirofilaria          FDSFNFFVFLS FMSVFVLGFI CVS----- -----EIL VGLVFYSCLV VFFSVCFYYS
Yarrowia             FNSFTFYIDM LIYFIMIVIS SLYGYNLYNN NLYKTLFEPK KELIILFLIN ILGALLIVHS
M. barkeri           RIGIPSVAGE ILAGVSLGVL FLEV----- ----- -ETGIITFFA ELGSIFFLLFT
Clustal Co          :: . : . . :

Trichomonas          KYIIEIENDFS SISQPYLVII SPPISKRLNI SNGVFLYKI NG-----TKY TFGTLYKFSD
Dirofilaria          GSFLVLYVYFV ELT--MIPML FCLLGYGRQV EKISACYYLI -----FYTL FFGMPYLFY
Yarrowia             NDFITLFAVAI ELQSYIYLI TAIYNSSYKA SKASMLYFFM GGILSILIAI SINTYYSVLN
M. barkeri           AGYKEVS-LK NLKFESITTL VPTLSQIVSA FVGFAGFGRI FN-FSPVESL FLGVAFNPTS
Clustal Co          : : : : : : : : :

Trichomonas          IHPNI--RID FNTSKKITQA VVR----- -VHIPIVKYA SALIKIATFL VTAACLFLS-
Dirofilaria          SHVFF--FMN FVYYDFFFSY EFIFLLSLCF LVKFPVYFLH VWLPKVVHEA PTSSSMILAG
Yarrowia             SYTLH--SLD SLIINTLDLN LILIALSLGL LFKIGIAPLH KWLISIYENT PILITIIYIS-
M. barkeri           IAVVIGTLID LNYLSSRPGT AMLSSAFLLD IIALFFFSVW VNFVRLNHVP PVLVLLIAG
Clustal Co          :: . : . : : : : : :

Trichomonas          -----Y KSSSIRPFLS QYFLIFLYSL FNLPPFSFDT LIRS-IITMT FWFGFISVSVF
Dirofilaria          VMLKLGAGV YRISKSFNY NFEFLIFFSL VSMIFCSFIC MVQSDCKSLA AYSSICHMGF
Yarrowia             LIPKISILSY LVLSN--ISI NSLVISILAI LTLVGVSVGG LLQIKIKRLL AFSGLTNAGY
M. barkeri           ----- ---KILLFLL IMYILGNLYF PRLFTYAEKM HSKEAVFSLV IMIALFSAYL
Clustal Co          . : : : : : : :

Trichomonas          LQVRILSSNI -PTIFSSLFV LIGLCSFSTI MTYFNSNFFY ISILLVVG-- LVAASIYLFY
Dirofilaria          VLLSELSMVY -YGKSMALVM MLSHGYTSVL MFYFIGEFYH --IANSR--- -LVYYLRGFF
Yarrowia             MLLLLLLNNN -EFSYLYYIT QYSISHLAIF MIIIFSIIYI NYINNQYNPI IYVNLKGLI
M. barkeri           AELFELHSAI GAFTGGILVS EIPLAKLQDI QSKVDGLAHG ILIPIFFAFI GFLIDPYILK
Clustal Co          : * . : : : : * :

Trichomonas          IGTAILSQFL LAVHFGWMTW IGLCIYFANI LRNMSITFQT SFFVDVMNSV IVSVFIVFQS
Dirofilaria          CVSMLFCLMF SLTMLSNGFG PSSITFFSEY --LMFNWFSS IFYISVLFVFF FYLLSFYYS
Yarrowia             HDNAYLVLSM AIVVFSFIGI PPLLGFFGKL N-ILMSILNN GYFISIVLI VASLISALYY
M. barkeri           NAGSFTLLII LAALMGKLAG ----GFIGSK VIGDFYESL IFGVGVMPRA GIELVILTMG
Clustal Co          : : : : : : : : :

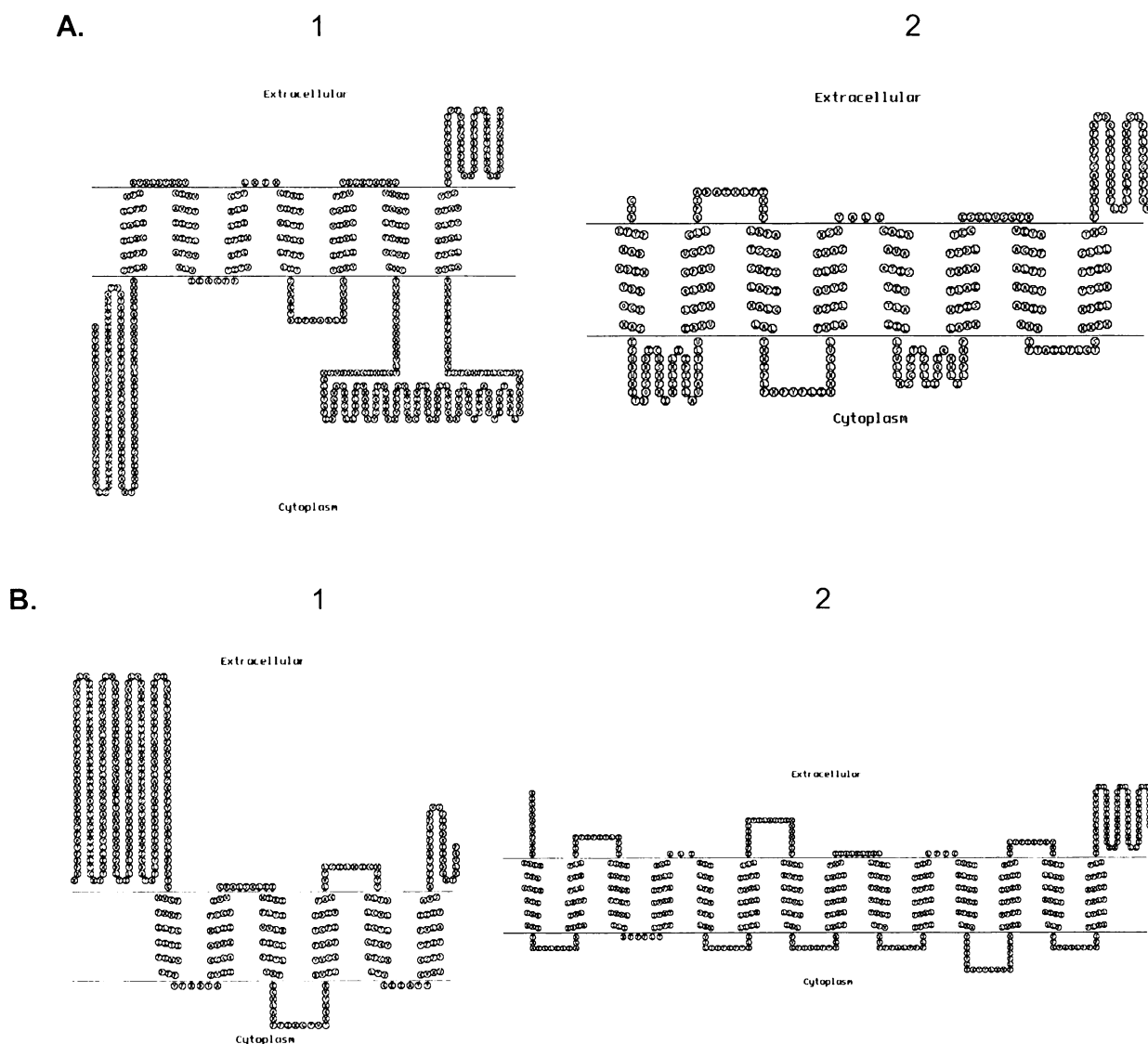
Trichomonas          IYLIGEPVKA KIPEAPLDQA AKINRIDQLL EKLADKEENG SRKF
Dirofilaria          IYVLICFFVG NKFSYVFDGR GIVCLPVMFM MYNFFWFIFVI
Yarrowia             LYLLNVSIIQD KNNILINSNE TVSSVLSYIL SSLIILITFG FIYNSLIIDI FNYYFN
M. barkeri           RELQIISQDT FSAMVLMVVV SILISPACMK WAIQARQRKD GWR|
Clustal Co          : : : : :

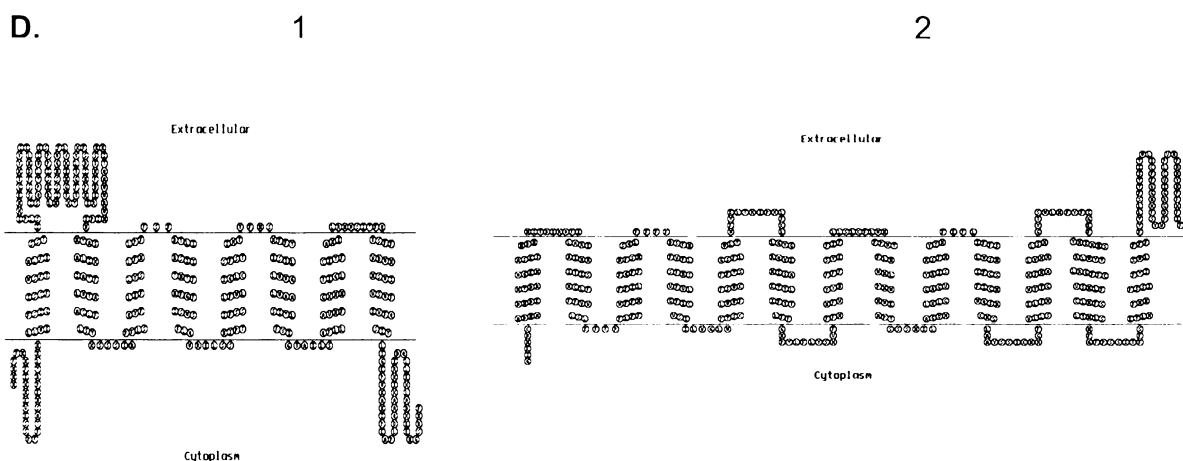
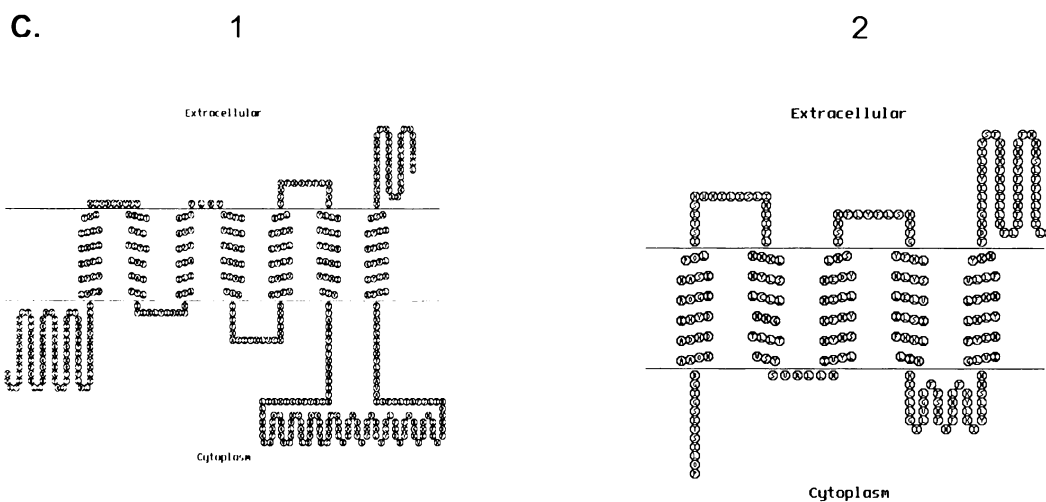
```

Vytipované podjednotky membránové části komplexu I nemají N-terminální adresové sekvence, které by je jako podjednotky Tvh22 a Tvh47 směřovaly do hydrogensomů (viz. obr. 11). Absence adresových sekvencí je však obvyklá u membránových proteinů, které mají adresové sekvence interní. Analýza vytipovaných proteinů pomocí programu TOPO2 (www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl) ukázala, že obsahují transmembránové domény, a jsou tedy pravděpodobně membránové (obr. 20).

Obr. 20. Pravděpodobné transmembránové podjednotky komplexu I

Porovnání transmembránových domén podjednotky TvhND1 (A1) a mitochondriální podjednotky ND1 (*Bos taurus*, A2). Transmembránové domény podjednotek TvhND2 (B1), TvhND4 (C1) a TvhND6 (D1) byly porovnány s doménami nejbližších mitochondriálních homologů nalezených v databázi NCBI za použití programu blastp (B2: *Naegleria gruberi*, C2: *Polistes humilis*, D2: *Dirofilaria immitis*). Podjednotky TvhND1, TvhND2 a TvhND4 mají C-koncové uspořádání transmembránových domén podobné jako jejich homology, u podjednotky TvhND6 ční C-konec proteinu do cytoplasmy, zatímco u mitochondriálního homologu do extracelulárního prostoru. Sekvence analyzovány programem TOPO2 (www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl)





5.2.2. Expres vytipovaných genů v *T. vaginalis*

V další části své diplomové práce jsem se pokusila o expresi rekombinantních proteinů odpovídajících potenciálním podjednotkám komplexu I v trichomonádách. V takto transformovaných trichomonádách by bylo možno určit buněčnou lokalizaci těchto genů.

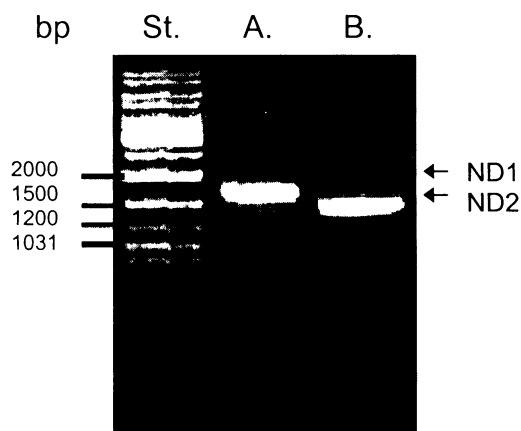
5.2.2.1. Příprava plasmidů s vloženými geny pro podjednotky komplexu I

5.2.2.1.1. Podjednotka TvhND1 a TvhND2

Geny pro tyto podjednotky byly amplifikovány z gDNA *T. vaginalis* za pomoci primerů TvhND1VspIF a TvhND1BamHIR (podjednotka TvhND1; obr. 21A), respektive TvhND2VspIF a TvhND2BamHIR (podjednotka TvhND 2; obr. 21B). Teplota nasedání primerů byla 61°C.

Obr. 21. Amplifikace genů TvhND1 (A) a TvhND2 (B) z gDNA *T. vaginalis*.

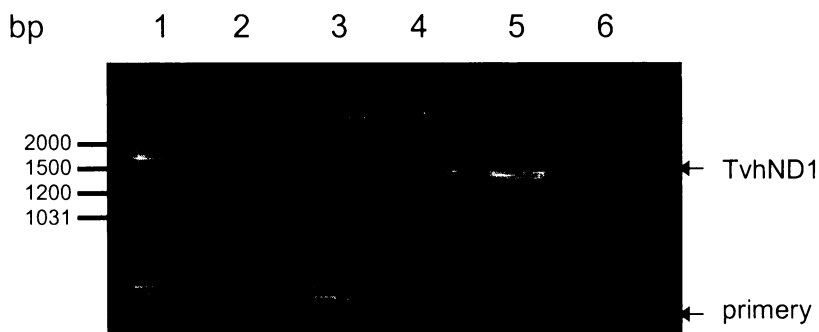
Velikost amplifikovaných genů je 1659 (podjednotka TvhND1) a 1440 (podjednotka TvhND2) bp. St. – standardy DNA



PCR produkty byly štěpeny restričními enzymy *VspI* a *BamHI* (v sekvenci podjednotek TvhND1 a TvhND2 se nachází restriční místo pro endonukleázu *NdeI*, proto byla použita endonukleáza *VspI*, která zanechává stejné kohezní konce). Plasmid pTagVag s hemaglutinovým (HA3) nebo streptavidinovým (STREP) tagem byl štěpen enzymy *NdeI* a *BamHI*. Podjednotka TvhND1 byla ligována do pTagVag s HA3 tagem, podjednotka TvhND2 do pTagVag s HA3 i streptavidinovým tagem. Vzniklými ligačními produkty byly transformovány bakterie *E. coli* kmene XL1 – Blue. Úspěšnost transformace byla ověřena PCR (obr. 21, obr. 22) a sekvenací plasmidů s vloženými geny.

Obr. 21. Zaklonování DNA do plasmidu TagVag-TvhND1-HA3 bylo ověřeno PCR.

1 – 6: kolonie XL-1-Blue nesoucí vektor TagVag-TvhND1-HA3

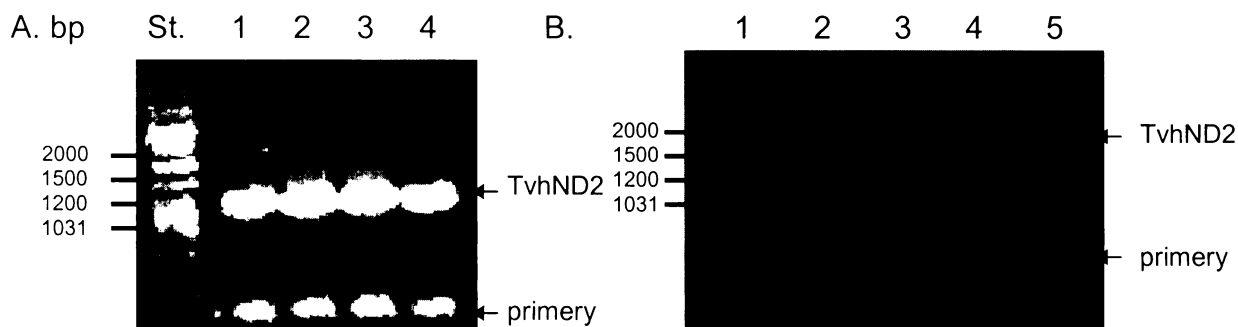


Obr. 22. Zaklonování podjednotky TvhND2 do vektorů TagVag-TvhND2-HA3 (A) a TagVag-TvhND2-STREP (B) bylo ověřeno PCR.

A. 1 – 4: kolonie XL-1-Blue nesoucí vektor TagVag-TvhND2-HA3

B. 1 – 5: kolonie XL-1-Blue nesoucí vektor TagVag-TvhND2-STREP

St. – standardy DNA

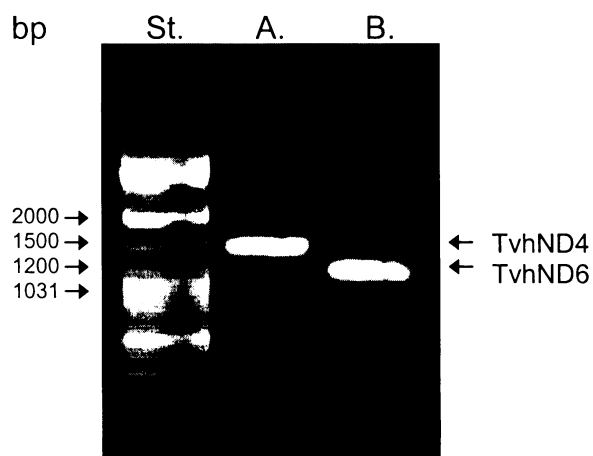


5.2.2.1.2. Podjednotka TvhND4 a TvhND6.

Geny podjednotek byly amplifikovány z gDNA *T. vaginalis* pomocí primerů TvhND4Nde/F a TvhND4Acc65/R (podjednotka TvhND4; obr. 23A) nebo TvhND6Nde/F a TvhND6Acc65/R (podjednotka TvhND6; obr. 23B). Teplota nasedání primerů je 55°C.

Obr. 23. Amplifikace podjednotky TvhND4 (A) a podjednotky TvhND6 (B) z gDNA *T. vaginalis*.

Velikost amplifikovaných genů je 1446 (podjednotka TvhND4) a 1134 bp (podjednotka TvhND6). St- standardy DNA



PCR produkty a plasmid pMasterNeo s HAHA tagem byly štěpeny enzymy *NdeI* a *Acc65I*. Poté byly ligovány v poměru 3 : 1 a plasmidy MasterNeo-TvhND4-HA3 a MasterNeo-TvhND6-HA3 byly transformovány buňky XL-1-Blue. Transformace byla ověřena PCR (obr. 24) a sekvenací.

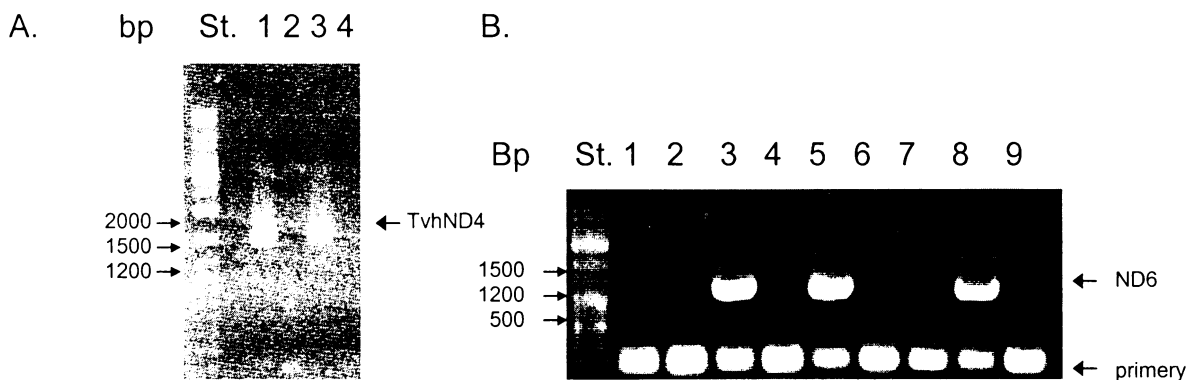
Obr. 24. Ověření transformace bakterií plasmidy MasterNeo-TvhND4-HA3 a MasterNeo-TvhND6-HA3 pomocí PCR.

Velikost PCR produktů o velikostech cca. 1500 a 1200 bp odpovídá podjednotce TvhND4 (A) a podjednotce TvhND6 (B).

(A) 1-4: kolonie bakterií nesoucích plasmid MasterNeo-TvhND4-HA3

(B) 1-9: kolonie bakterií nesoucích plasmid MasterNeo-TvhND6-HA3

St. – standardy DNA



5.2.2.2. Expresse rekombinantních proteinů v *T. vaginalis*.

Trichomonády kmene T1 byly transformovány plasmidy MasterNeo-TvhND1-HA3, MasterNeo-TvhND2-HA3, MasterNeo-TvhND2-STREP, MasterNeo-TvhND4-HA3 a MasterNeo-TvhND6-HA3. Po selekci transformantů byl homogenát trichomonád rozdělen na 12% SDS – PAGE a blotován na nitrocelulózovou membránu. K detekci podjednotek komplexu I byla použita protilátka hemaglutinového a v případě podjednotky TvhND2 i streptavidinového tagu. Rekombinantní podjednotky se mi však nepodařilo identifikovat ani v jednom případě.

5.2.3. Exprese podjednotky 6 v bakteriích.

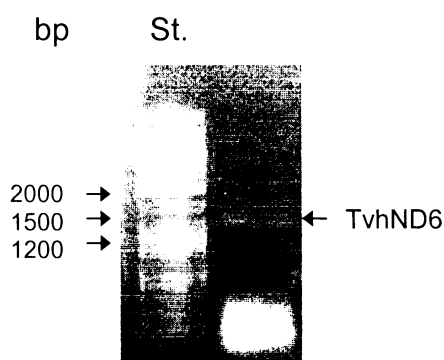
Protože exprese rekombinantních podjednotek TvhND1, TvhND2, TvhND4 a TvhND6 v trichomonádách byla neúspěšná, pokusila jsem se o expresi podjednotky TvhND6 v bakteriích. Rekombinantní protein produkovaný v bakteriích by mohl být použit pro přípravu specifické protilátky proti podjednotce TvhND6

5.2.3.1. Příprava bakteriálního expresního plasmidu s vloženým genem podjednotky TvhND6.

Gen pro podjednotku TvhND byl amplifikován z gDNA *T. vaginalis* použitím primerů TvhND6NdeI/F a TvhND6XhoI/R při teplotě nasedání primerů 58°C (obr. 25).

Obr. 25. Amplifikace podjednotky TvhND6 z gDNA *T. vaginalis*.

St. – standardy DNA



PCR produkt byl zaligován do plasmidu pGEM T – Easy a plasmidem pGEM T-Easy-TvhND6 byly transformovány buňky XL-1-Blue. Transformace byla ověřena PCR a sekvenací a z jedné pozitivní kolonie byla izolována plasmidová DNA.

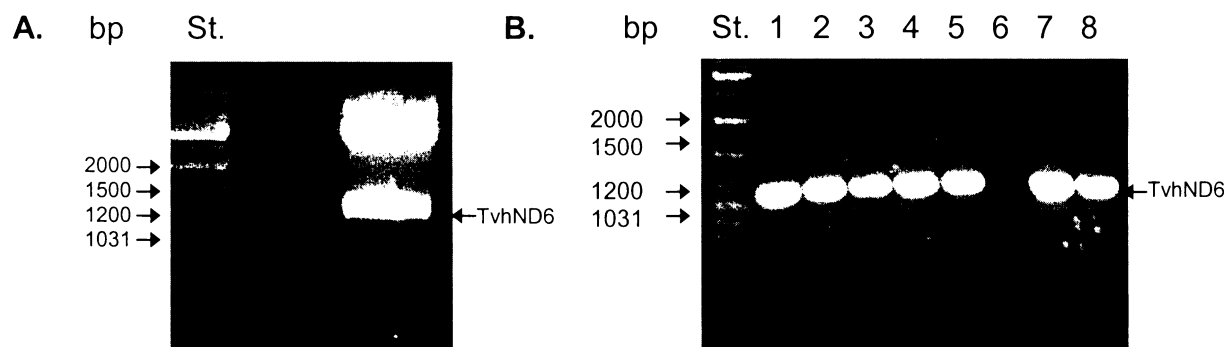
Z této DNA byl insert podjednotky TvhND6 vyštěpen endonukleázami *NdeI* a *XhoI* (obr. 26A). Stejnými enzymy byl štěpen i bakteriální expresní plasmid pET28a s polyhistidinovým tagem. Insert byl zaligován do štěpeného vektoru v poměru 3 : 1 a byly jím transformovány buňky XL-1-Blue. Správnost ligace byla ověřena PCR (obr 26B).

Obr. 26. Vyštěpení genu podjednotky TvhND6 z pGEM T–Easy-TvhND6 (A) a ověření ligace do pET28-TvhND6-His pomocí PCR (B).

(A) DNA o velikosti cca. 1200 bp odpovídá genu podjednotky TvhND6.

(B) 1 – 8: kolonie *E. coli* nesoucí plasmid pET28a-TvhND6-His.

St. – standardy DNA

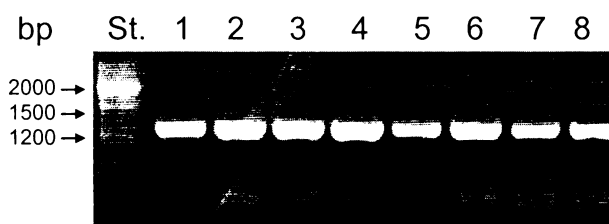


5.2.3.2. Transformace expresních bakterií BL21

Plasmid pET28a-TvhND6-His byl izolován z buněk XL-1-Blue (QIAprep Spin Miniprep Kit) a použit k transformaci bakterií BL21 (viz. 4.5.10.2.). Transformace byla ověřena pomocí PCR na vybraných koloniích (obr. 27). Pozitivní transformanty byly pro další použití skladovány při -70°C v 15% glycerolu.

Obr. 27. Ověření transformace buněk BL21 plasmidem pET28a-TvhND6-His.

1-8: kolonie nesoucí plasmid pET28a-TvhND6-His. DNA o velikosti cca. 1200 bp odpovídá podjednotce TvhND6. St. – standardy DNA

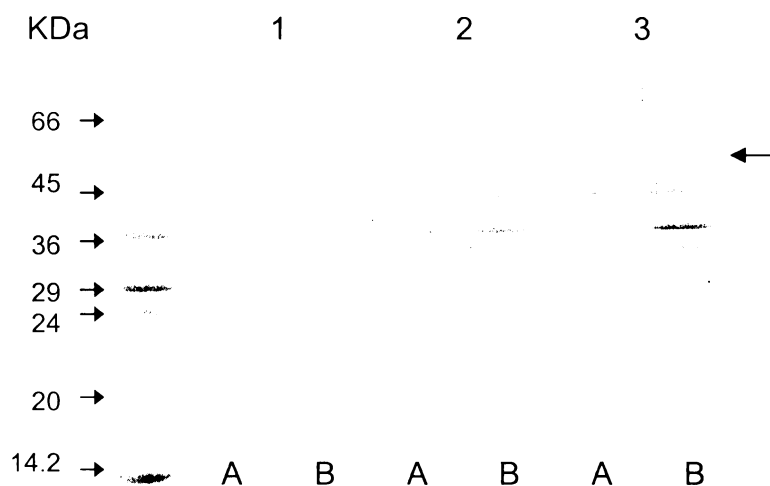


5.2.3.3. Indukce exprese rekombinantního proteinu TvhND6-His

Expese rekombinantního proteinu byla indukována v osmi klonech přidáním 0.5 mM IPTG (viz. 4.6.8.1.). Na SDS – PAGE byl v indukovaných bakteriích jeden proteinový band o velikosti cca. 50 kDa zřetelnější oproti bakteriím neindukovaným (obr. 28). Imunobloting analýza ale neodhalila přítomnost penta histidinového tagu v žádném z produkovaných proteinů. Rekombinantní podjednotka TvhND6 tedy patrně nebyla produkována.

Obr. 28. SDS – PAGE analýza bakterií BL 21 transformovaných plasmidem pET28a-TvhND6-His.

1-3: Kolonie bakterií BL21; A – neindukované bakterie; B – indukované bakterie
šipka značí proteinový band silněji exprimovaný v indukovaných bakteriích



5.2.4. Vyhledávání podjednotek komplexu I pomocí afinitní chromatografie

5.2.4.1. Chromatografie na Ni – NTA koloně

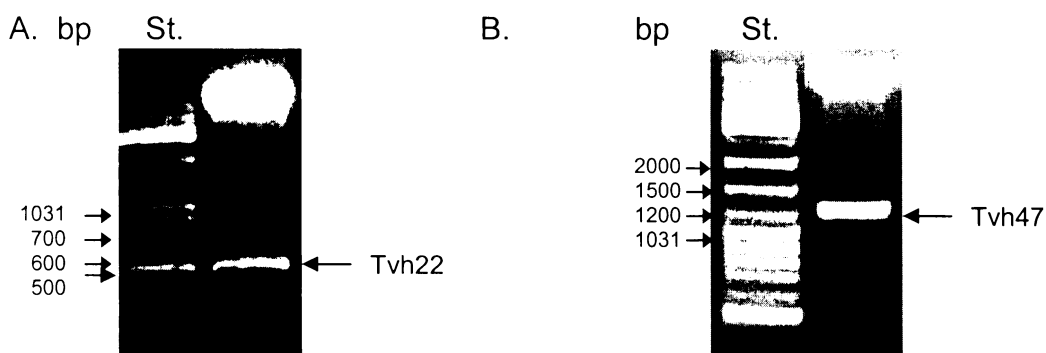
Ke zjištění, zda komplex I *Trichomonas vaginalis* obsahuje ještě nějaké další podjednotky byla kromě hledání v genomových databázích použita také metoda chromatografie na Ni–NTA koloně. Pro tuto strategii jsem připravila linie *T. vaginalis* produkující rekombinantní podjednotky Tvh22 a Tvh47 značené na C – konci polyhistidinovým tagem, který specificky interaguje s imobilizovaným niklem. Pokud jsou tyto podjednotky integrovány do komplexu I, mohly by umožnit zachycení celého komplexu pomocí afinitní chromatografie.

5.2.4.1.1. Konstrukce plasmidů MasterNeo-Tvh22-His a MasterNeo-Tvh47-His

Geny pro podjednotky Tvh22 a Tvh47 byly vyštěpeny z plasmidů MasterNeo-Tvh22-HA3 a MasterNeo-Tvh47-HA3 (viz 5.1.1.) restrikcími enzymy *NdeI* a *Acc65I* (obr. 29). Stejnými enzymy byl štěpen plasmid Master Neo obsahující penta histidinový tag.

Obr. 29. Vyštěpení podjednotek Tvh22 z plasmidu MasterNeo-Tvh22-HA3 (A) a Tvh47 z plasmidu MasterNeo-Tvh47-HA3 (B).

Velikost genů je 606 (Tvh22) a 1287 (Tvh47) bp. St. – standardy DNA



Restrikční produkty byly izolovány z gelu a ligovány do plasmidu MasterNeo-His. Buňky *E. coli* XL-1-Blue byly transformovány teplotním šokem a vysety na plotny s LB médiem a ampicilinem (100 μ l/ μ g). Přítomnost vektoru s požadovaným genem byla ověřena PCR (obr. 30) a restrikční analýzou.

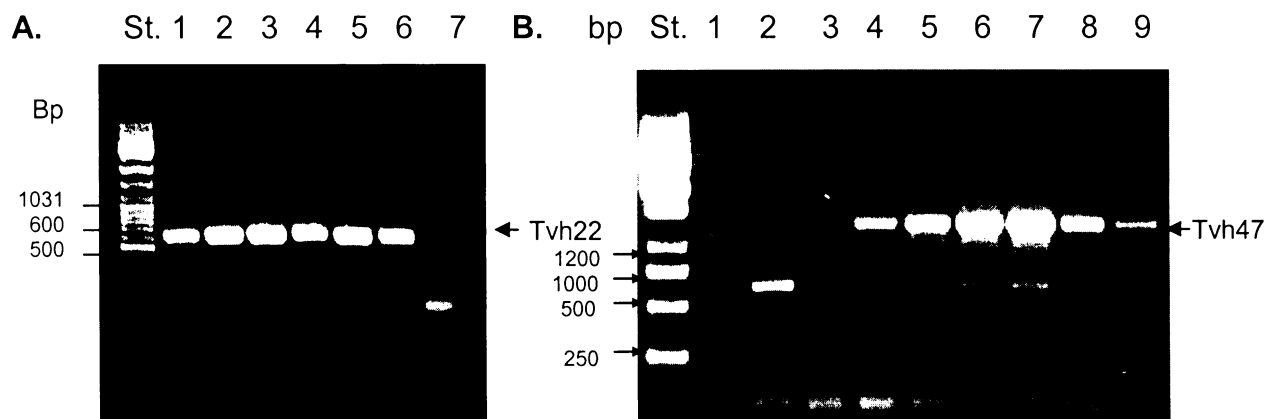
Obr. 30. Ověření přítomnosti vektorů s geny Tvh22-His (A) a Tvh47-His (B) pomocí PCR na vybraných koloniích *E. coli*.

(A) 1-7: Kolonie nesoucí plasmid MasterNeo-Tvh22-His.

(B) 1-9: Kolonie nesoucí plasmid MasterNeo-Tvh47-His.

DNA o velikosti kolem 600 (A) a 1300 (B) bp odpovídá genům Tvh22 a Tvh47.

St. – standardy DNA.



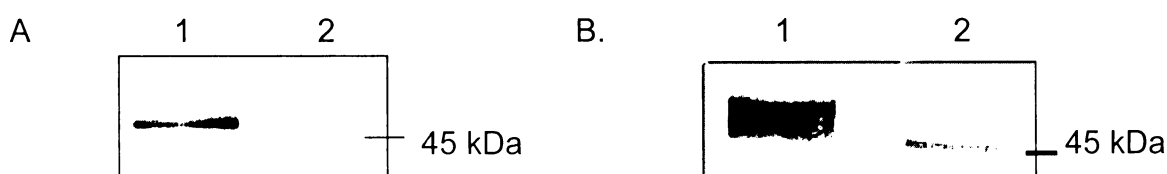
5.2.4.1.2. Exprese proteinů Tvh22-His a Tvh47-His v trichomonádách

Buňky *T. vaginalis* byly transformovány vždy jedním ověřeným vektorem MasterNeo-Tvh22-His a MasterNeo-Tvh47-His. Po transformaci trichomonád byla exprese genů ověřena SDS – PAGE a imunodetekcí protilátkou proti polyhistidinovému tagu. Purifikace proteinů značených penta histidinovým tagem je výrazně snadnější a levnější než purifikace proteinů s hemaglutinovým tagem. Bohužel se ukázalo, že značení histidinovým tagem výrazně snižuje expresi proteinů v trichomonádách. Podjednotku Tvh22 se nepodařilo produkovat ani po opakované přípravě transformovaných linií. Podjednotka Tvh47 byla produkována slabě (obr. 31, obr. 32). Proto jsem k dalším pokusům používala pouze trichomonády produkující podjednotku Tvh47-His.

Obr. 31. Detekce podjednotky Tvh47-His v hydrogenosomech *T. vaginalis*.

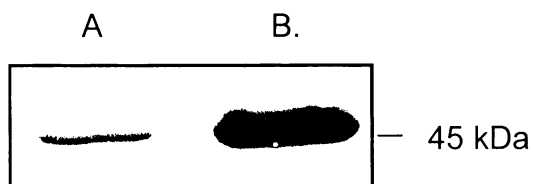
(A) Podjednotka Tvh47-His byla identifikovaná pomocí imunoblotingu s využitím myší monoklonální protilátky proti polyhistidinovému tagu. Protein byl detekován pouze u trichomonád transformovaných plasmidem MasterNeo-Tvh47-His (1), u rodičovského kmene T1 (2) nebyl protein identifikován.

(B) Imunobloting s protilátkou proti podjednotce Tvh47. V hydrogenosomech trichomonád transformovaných plasmidem MasterNeo-Tvh47-His (1) byl protein silně produkován, u rodičovského kmene T1 (2) bylo množství proteinu výrazně nižší.



Obr. 32. Porovnání exprese proteinů značených HA3 a His tagem.

Rekombinantní proteiny Tvh47-His (A) a Tvh47-HA3 (B) byly identifikovány protilátkou proti polyhistidinovému (A) a hemaglutinovému tagu (B). Produkce proteinů značených polyhistidinovým tagem je výrazně nižší než produkce proteinů značených HA3 tagem.



5.2.4.1.3. Chromatografie na Ni – NTA koloně

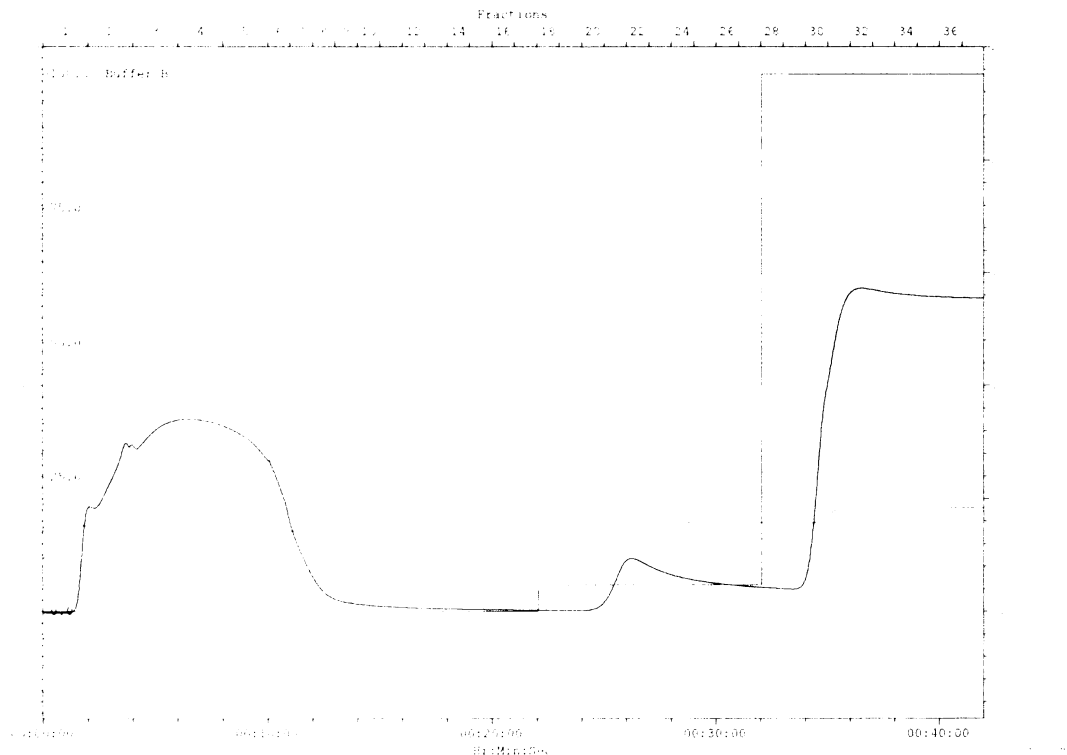
Hydrogenosomy izolované z trichomonád produkujících protein Tvh47-His byly jemně solubilizovány octylglukosidem (viz. 4.6.5.) byly nanесeny na Ni – NTA kolonu. Imobilizované proteiny byly eluovány pufrům s 400 mM imidazolem (obr. 33). Měření NADH dehydrogenázové aktivity (NDH, viz. 4.6.6.) v jednotlivých frakcích byly identifikovány frakce obsahující komplex I.

Stejný postup byl proveden i s hydrogenosomy rodičovských trichomonád kmene T1. Tím byl ošetřena možnost falešně pozitivních výsledků (pokud by proteiny byly na koloně imobilizované jiným způsobem než přes penta histidinový tag).

Obr. 33. Purifikace Tvh47-His pomocí afinitní chromatografie na Ni – NTA koloně.

Absorbční vrchol v oblasti frakcí 1 - 6 odpovídá absorbanci pufru s 10 mM imidazolem, vrchol ve frakcích 30 – 36 pak 400 mM imidazolu. Proteinový vrchol se překrývá s vrcholem absorbance 400 mM imidazolu. NADH dehydrogenázová aktivita komplexu I byla zjištěna ve frakcích 30 a 31.

Černá křivka = aktuální koncentrační gradient solí, červená křivka = teoretický gradient solí.

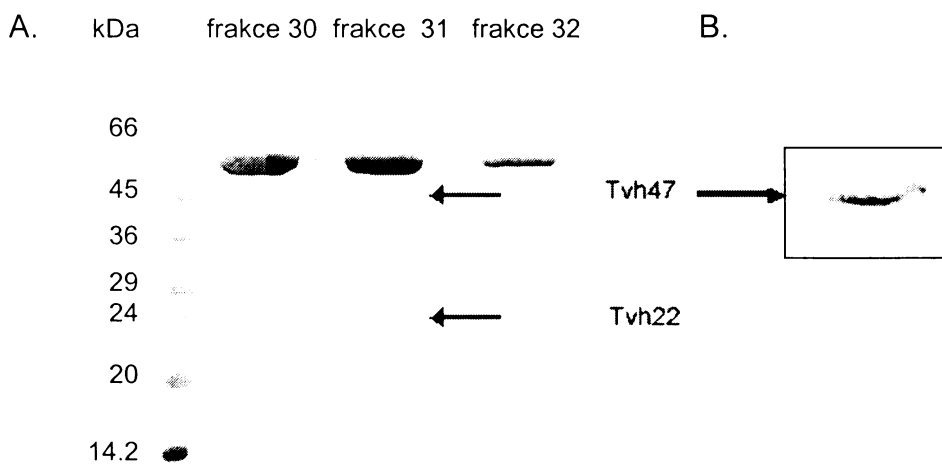


5.2.4.1.4. Identifikace proteinů izolovaných společně s Tvh47-His

Proteiny frakcí s NADH dehydrogenázovou aktivitou byly rozděleny na polyakrylamidovém gelu a detekovány obarvením Coomassie Brilliant Blue (obr. 34). Poté byly přeneseny na nitrocelulósovou membránu a přítomnost komplexu I byla ověřena protilátkou proti podjednotce Tvh47. Stejný postup byl použit i u kontrolních hydrogenosomů kmene T1. Z těchto hydrogenosomů nebyl komplex I izolován (obr. 35).

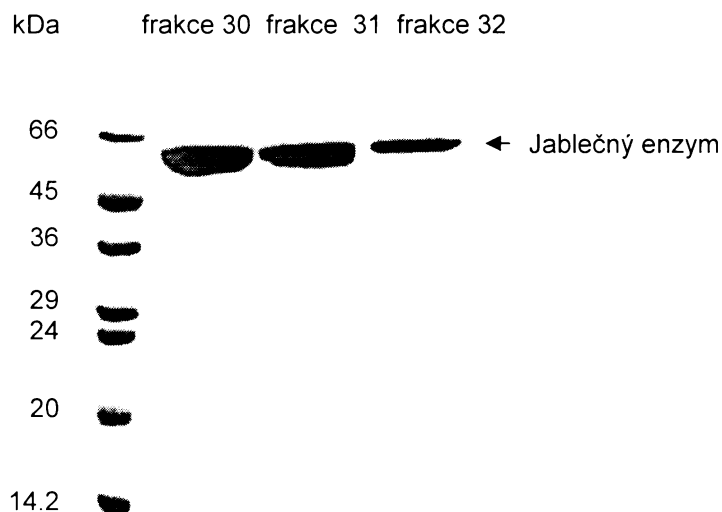
Obr. 34. Analýza proteinů frakcí s NADH dehydrogenázovou aktivitou získaných afinitní chromatografií.

- A. SDS – PAGE analýza frakcí 30 – 32. NADH dehydrogenázová aktivita byla detekovaná ve frakcích 30 a 31, ve stejných frakcích jsou patrné dvě podjednotky komplexu I Tvh22 a Tvh47.
- B. Přesná identifikace podjednotky Tvh47. Dvojitý proteinový band patrný na SDS-PAGE analýze frakce 31 byl po přebílení na nitrocelulósovou membránu označen a následně byla použita specifická protilátka proti Tvh47. Podjednotce odpovídá horní z dvojice proteinů.



Obr. 35. SDS-PAGE analýza frakcí 30 – 32 získaných afinitní chromatografií hydrogenosomů trichomonád rodičovského kmene T1.

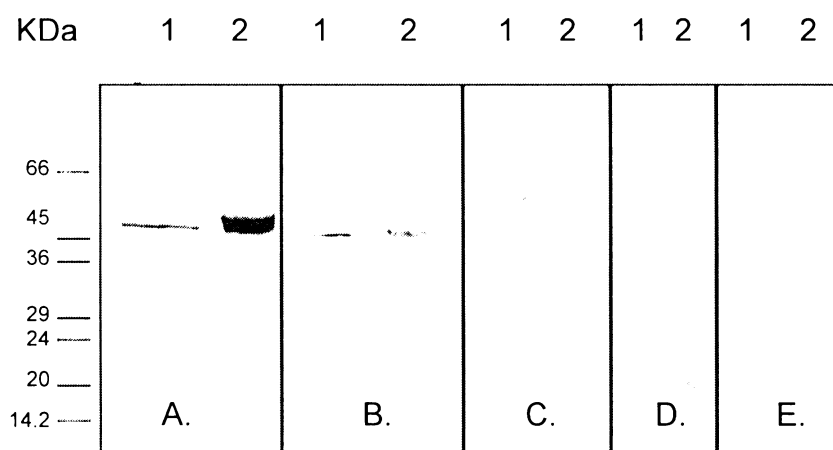
NADH dehydrogenázová aktivita ani podjednotky komplexu I Tvh22 a Tvh47 nebyly v těchto frakcích přítomny.



SDS-PAGE analýza frakcí s NADH dehydrogenázovou aktivitou (obr. 34) ukázala, že společně s podjednotkou Tvh47-His kopurifikovaly proteiny o velikostech cca. 22-, 60- a 45 kDa. Již dříve bylo hmotnostní spektrometrií zjištěno, že protein o velikosti 22 kDa odpovídá podjednotce komplexu I Tvh22 (Hrdý *et al.*, 2004). Ostatní dva proteiny (60- a 45 kDa) by mohly představovat některé známé hydrogenosomální enzymy, které při použití metody cross – linkingu kopurifikují s Tvh47 (Dyall *et al.*, 2004), nebo další podjednotky komplexu I. K jejich identifikaci jsem proto použila protilátky, které máme k dispozici v naší laboratoři (protilátka proti Tvh47, polyhistidinovému tagu, jablečnému enzymu, feredoxinu a pyruvát:feredoxin oxidoreduktáze). Zjistila jsem, že protein o velikosti 60 kDa odpovídá jablečnému enzymu (obr. 36). Pomocí kontrolní afinitní chromatografie hydrogenosomální frakce rodičovských trichomonád kmene T1 (ob. 35) jsem zároveň dokázala, že jablečný enzym se váže nespecificky na Ni-NTA kolonu a nekopurifikuje specificky s podjednotkou Tvh47. Protein o velikosti 45 kDa nereagoval s žádnou z použitých protilátek. Z výsledků pokusů Tamary Smutné (naše laboratoř) vyplývá, že se může jednat o feredoxin : oxygen oxidoreduktázu.

Obr. 36. Immunobloting analýza proteinů kopurifikovaných s Tvh47-His.

Imunoblotem s protilátkami proti podjednotce Tvh47 (A), polyhistidinovému tagu (B) a jablečnému enzymu (C) byly odpovídající proteiny identifikovány ve frakci 31 afinitní chromatografie hydrogenosomů trichomonád produkujících Tvh47-His (1) i ve výchozím lyzátu hydrogenosomů (2). Protilátkami proti feredoxinu (D) a pyruvát : feredoxin oxidoreduktáze (E) byly příslušné proteiny identifikovány pouze ve výchozím hydrogenosomálním lyzátu (2).



5.2.5. Pokus o izolaci komplexu I pomocí “Blue Native Gel Electrophoresis (BN – PAGE)”

5.2.5.1. Volba vhodného detergentu a poměru detergent : Serva Blue G

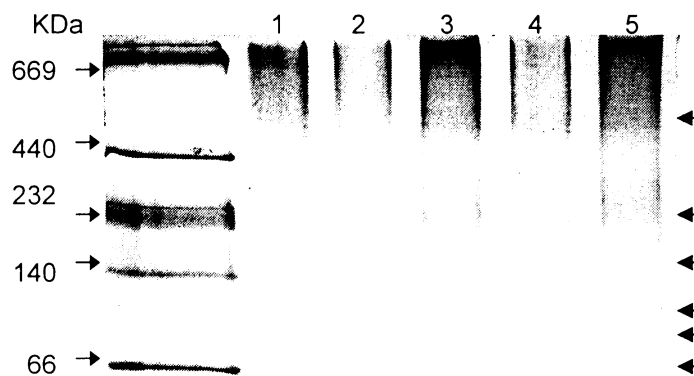
Hydrogenosomy byly solubilizované různými detergenty (Tab. 7) a smíchány s barvou Serva Blue G (SBG) v různých poměrech. Nejlepšího rozdělení proteinových komplexů jsem dosáhla použitím 0.25% CHAPSO, ke kterému nebylo přidáno žádné SBG. Takto se mi podařilo separovat asi 6 hydrogenosomálních komplexů (obr. 37).

Tab. 7. Použité detergenty a jejich koncentrace.

detergent	finální koncentrace
Octylglukosid	0.5%
Octylglukosid	1%
Triton Tx – 100	0.05 %
Triton TX – 100	0.125%
Triton TX – 100	0.25%
Triton TX – 100	0.5%
Triton TX – 100	1%
Dodecylmaltosid (DDM)	0.25%
Dodecylmaltosid (DDM)	0.5%
Dodecylmaltosid (DDM)	1%
CHAPSO	0.25%
CHAPSO	0.5%

Obr. 37. Separace hydrogenosomálních komplexů pomocí BN-PAGE.

Hydrogenosomy kmene T1 byly solubilizovány 0.25% CHAPSO + 0.0125 mg SBG (1), 0.5% octylglukosidem + 0.025 mg SBG (2), 0.5% DDM + 0.025 mg SBG (3), 0.05% Tritonem TX-100 + 0.0025 mg SBG (4) a 0.25% CHAPSO + 0 mg SBG (5). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo solubilizací 0.25% CHAPSO bez přidaného SBG (5). Šipky označují izolované hydrogenosomální komplexy.



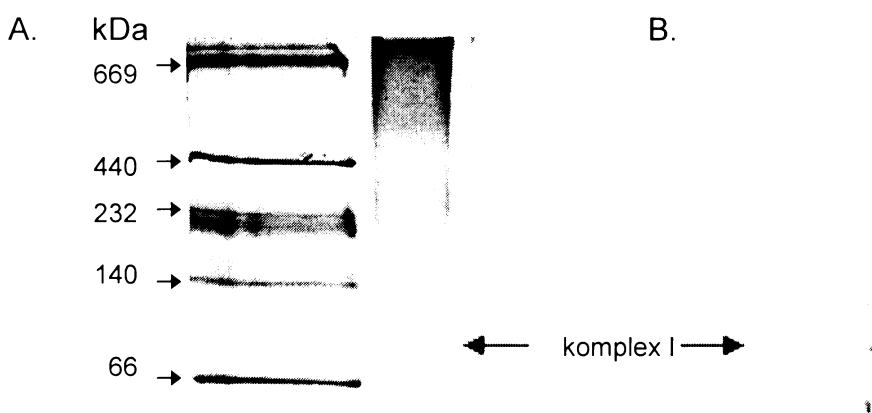
5.2.5.2. Identifikace hydrogenosomálních komplexů rozdělených pomocí BN-PAGE

Izolované proteinové komplexy byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (pro blotování proteinů se používá katodový pufr). Imunodetekcí protilátkou proti podjednotce Tvh47 byl identifikován komplex I (obr. 38). Jeho velikost je cca. 70 kDa, což ukazuje, že je tvořen pouze podjednotkami Tvh22 (22 kDa) a Tvh47 (47 kDa). Imunoblotingem s protilátkou proti jablečnému enzymu

se mi podařilo dokázat, že tento enzym netvoří komplex s podjednotkami Tvh22 a Tvh47. Byl identifikován pouze v komplexu o velikosti cca. 230- a 400 kDa (obr. 39). Třetím identifikovaným komplexem o velikosti cca. 90 kDa je feredoxin : oxygen oxidoreduktáza (obr.40).

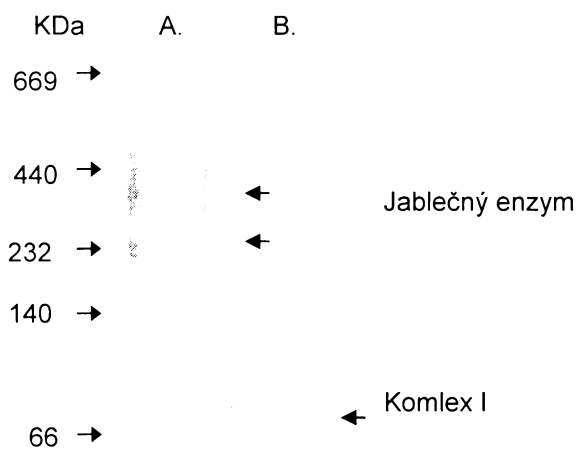
Obr. 38. Identifikace komplexu I v hydrogenosomech kmene TVT1 rozdělených pomocí BN - PAGE.

V hydrogenosomech rozdělených metodou BN – PAGE (A) byl komplex I identifikován imunoblotingem protilátkou proti podjednotce Tvh47 (B). Velikost komplexu je cca. 70 kDa.

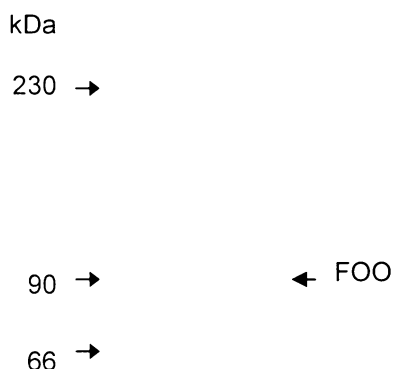


Obr. 39. Identifikace jablečného enzymu v hydrogenosomech *T. vaginalis* rozdělených metodou BN-PAGE.

Jablečný enzym byl identifikován králičí polyklonální protilátkou proti tomuto enzymu (A) v komplexech o velikostech cca 230- a 400 kDa. V komplexu I identifikovaném protilátkou proti podjednotce Tvh47 (B) není jablečný enzym přítomen.



Obr. 40. Identifikace feredoxin : oxygen oxidoreduktázy (FOO) v hydrogenosomech *T. vaginalis* izolovaných pomocí BN-PAGE.



Pro ověření podjednotek komplexu I byl příslušný proteinový komplex vyříznut z gelu a proteiny byly rozděleny SDS – PAGE. Přesto, že k detekci proteinů bylo použito stříbření, které je až 50x citlivější než barvení pomocí Coomasie, nepovedlo se žádné proteiny detekovat.

5.2.6. Purifikace komplexu I kapalinovou chromatografií

Další metodou použitou k detekci podjednotek komplexu I byla purifikace tohoto komplexu z hydrogenosomů *T. vaginalis* kapalinovou chromatografií. Druhým účelem bylo zjistit přesné místo štěpení adresových sekvencí podjednotek Tvh22 a Tvh47.

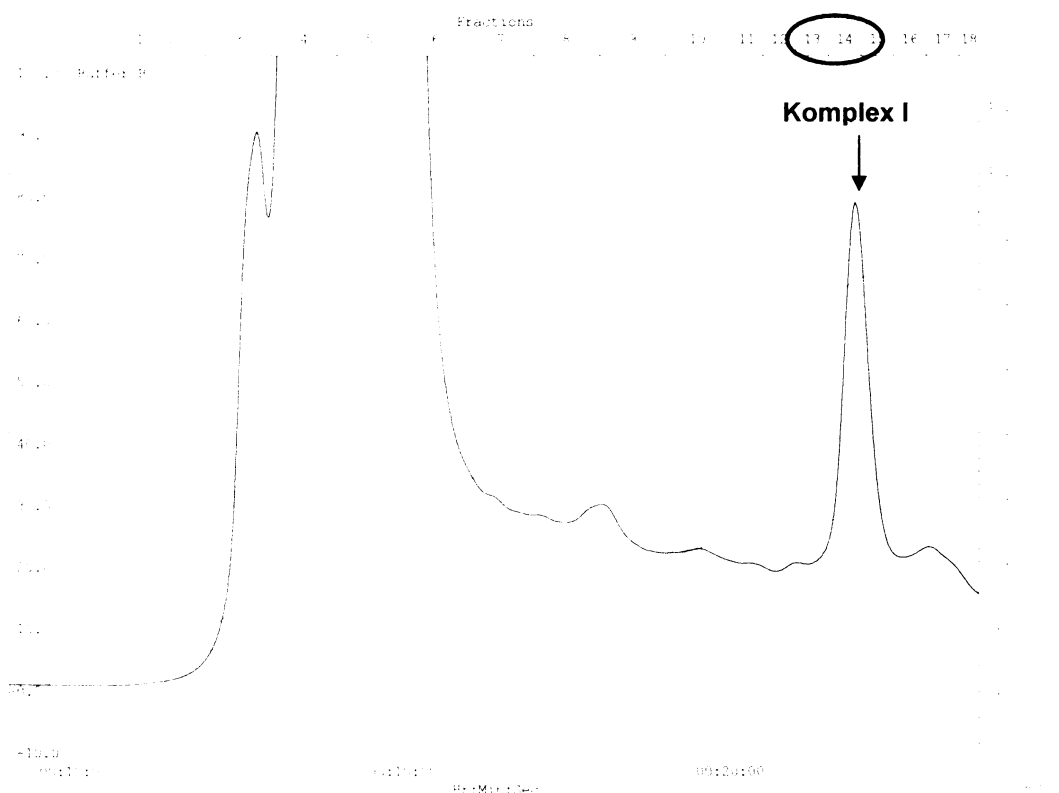
5.2.6.1. Purifikace komplexu I na monoS katexu a na hydroxyapatitu

Hydrogenosomy trichomonád kmene T1 byly solubilizovány 2% octylglukosidem (viz. 4.6.5.) a komplex I byl purifikován na katexu monoS a keramickém hydroxyapatitu. Během celé purifikace byly odebírány vzorky frakcí na stanovení množství proteinů podle Lowryho (viz. 4.6.7.) a enzymatické aktivity (viz. 4.6.6., Tab. 8.). Při purifikaci na katexu monoS se komplex I nacházel ve frakcích 13 a 14 (obr. 41). Obě frakce byly smíchány a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Tato analýza ukázala, že společně s podjednotkami Tvh22 a Tvh47 se purifikoval také jablečný enzym (60 kDa) a další čtyři proteiny o velikosti cca. 30 – 36 kDa (obr. 42). Tyto proteiny byly vyříznuty z polyakrylamidového gelu a zaslány k sekvenaci pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI ESI - QTOF). Zbýlý pool frakcí 13 a 14 byl dále nanesen na hydroxyapatit a purifikován. NADH dehydrogenázová aktivita byla

detekovaná ve frakcích 15 a 16 purifikace na keramickém hydroxyapatitu (obr. 43). Obě frakce byly smíchány a pomocí SDS-PAGE jsem zjistila, že NADH dehydrogenázová aktivita odpovídá přítomnosti podjednotek Tvh22 a Tvh47 (obr. 44).

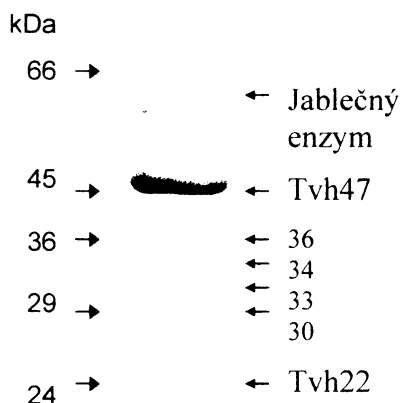
Obr. 41. Purifikace komplexu I na monoS katexu.

Enzymatická aktivita komplexu I byla naměřena ve frakcích 13 a 14. Po osmnácté frakci byla purifikace zastavena. Černou křivkou je značena aktuální koncentrace solí (vodivost), červená křivka značí teoretický gradient solí.



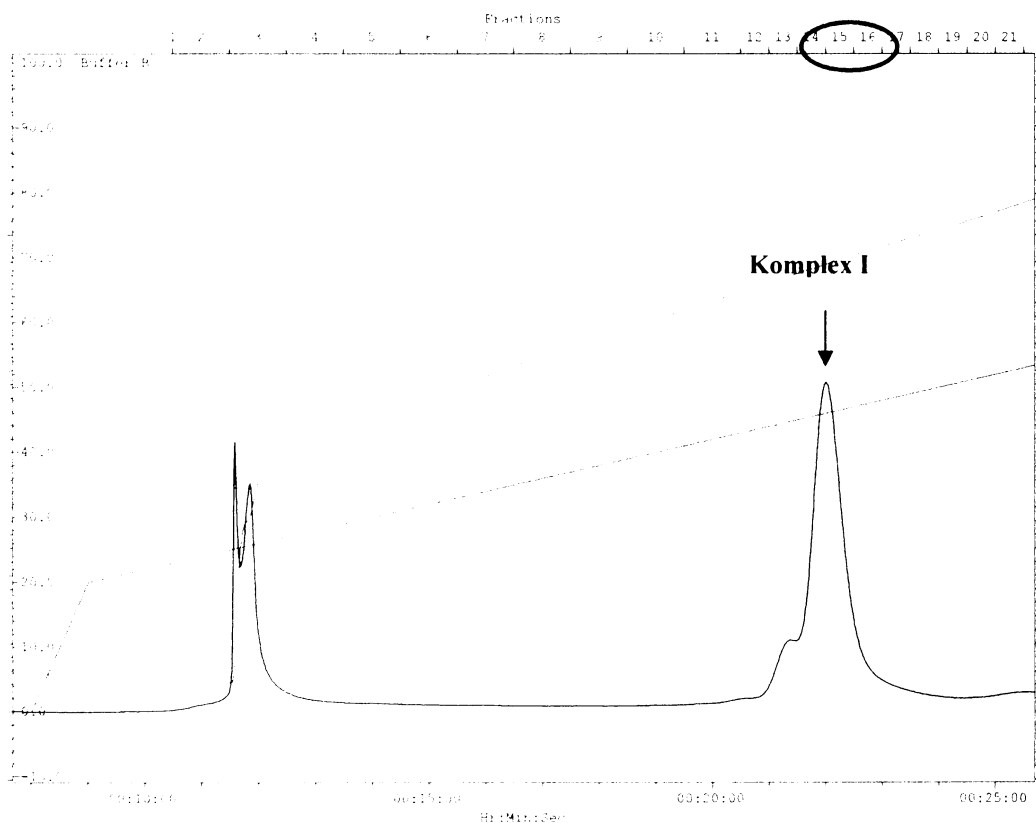
Obr. 42. SDS – PAGE analýza poolu frakcí s NDH aktivitou (13 a 14) po purifikaci na monoS katexu.

Podjednotkám Tvh22 a Tvh47 odpovídají proteinové bandy o relativních molekulových hmotnostech 22- a 47 kDa. Neznámé proteiny o relativních molekulových hmotnostech 30 - 36 kDa použité pro další analýzu hmotnostní spektrometrií (MALDI ESI - QTOF) jsou označené šipkou.



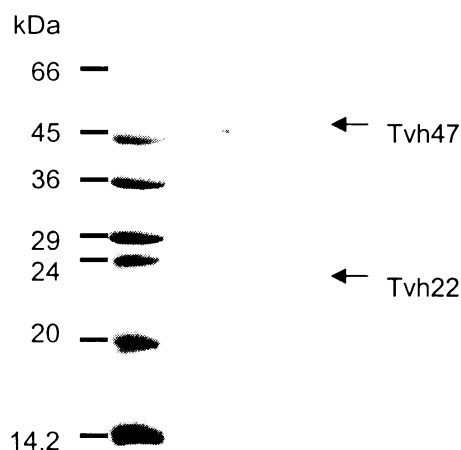
Obr. 43. Purifikace komplexu I na hydroxyapatitu.

NADH dehydrogenázová aktivita byla detekovaná ve frakcích 15 a 16. Po 21. frakci byla purifikace zastavena.



Obr. 44. SDS – PAGE analýza frakcí s NADH dehydrogenázovou aktivitou po purifikaci na hydroxyapatitu.

Na SDS-PAGE byla nanášena směs frakcí 15 a 16 purifikace na hydroxyapatitu. Proteiny o velikostech 47- a 22 kDa odpovídají podjednotkám Tvh47 a Tvh22.



Tab. 8. Tabulka průběhu purifikace komplexu I z hydrogenosomů TVT1

purifikační krok	celkové množství proteinu (mg)	celková aktivita (U)	specifická aktivita (U/mg)
hydrogenosomy	18.4201	11.0354	0.5991
monoS	0.2706	2.8305	10.4601
hydroxyapatit	0.0246	0.5723	23.2381

5.2.6.2. Analýza proteinů kopurifikovaných s Tvh22 a Tvh47 pomocí MALDI ESI - QTOF

Proteiny o velikostech cca. 30 – 36 kDa, kopurifikované na monoS katexu s Tvh22 a Tvh47, byly sekvenovány pomocí hmotnostní spektrofotometrie ESI - QTOF (Juraj Lenčo, Oddělení molekulární patologie, Vojenská lékařská akademie, Hradec Králové). Proteinový band o velikosti cca. 36 kDa obsahuje neúplné ORF pěti genů odpovídajících jablečnému enzymu: (1) gen A (89154.m00274), (2) gen B (88273.m00372), (3) gen C (94635.m00002), (4) gen F (86485.m00602) a (5) gen H (92066.m00127). Sekvenované proteinové štěpy, vzniklé štěpením proteinového bandu proteázou trypsinem, pokrývají celkovou sekvenci jablečného enzymu v 35% (gen H), 37% (geny B a C) a 42% (geny A a F).

Tři proteinové bandy o molekulárních hmotnostech 30 – 34 kDa tvoří různé formy podjednotky α enzymu sukcinyl – CoA ligázy: (1) α STK gen 1 (9100.m00020), (2) α STK gen 2 (81907.m00068) a (3) α STK gen 3 (85876.m00224) s procentem pokrytí od 23 – 47%. V každém proteinovém bandu jsou přítomny všechny uvedené formy α STK (gen 1, 2 a 3). Tyto výsledky odpovídají předchozím zjištěním, že podjednotka α STK tvoří při analýze na 12% SDS-PAGE tři distinktní proteinové bandy o molekulových hmotnostech 31-35 kDa (Lahti et. al, 1994).

5.2.6.3. Sekvence N – koncových aminokyselin podjednotek Tvh22 a Tvh47

Pro expresi nativního enzymu v bakteriích je nutné vědět, zda a kde dochází k odštěpení adresových sekvencí podjednotek Tvh22 a Tvh47. Adresové sekvence zajišťují přenos proteinů vznikajících v cytoplasmě přes dvojitou membránu do mitochondrie. Stejný mechanismus přenosu proteinů byl zjištěn také u hydrogenosomů (Bradley *et al.*, 1997). Po transportu do mitochondriální nebo hydrogenosomální matrix jsou adresové peptidy odštěpeny. K odštěpení dochází v přesně stanovených místech, ve většině případů tato místa obsahují arginin v pozici R -2 [xRx↓xx]. Méně obvyklý je arginin v pozici R - 3 [xRxx↓xx] (Bradley *et al.*, 1997).

U podjednotek Tvh22 a Tvh47 komplexu I z hydrogenosomů *T. vaginalis* byly adresové sekvence predikovány programem PSORT II. Podjednotka Tvh22 má adresovou sekvenci začínající methioninem, leucinem a alaninem, obsahující dva seriny (celkem 10 aminokyselin), sekvence je odštěpena v pozici arginin (R) -2. Adresovou sekvenci podjednotky Tvh47 tvoří 9 aminokyselin, začíná rovněž motivem methionin - leucin - alanin a je odštěpena v pozici R -2 (Tab. 9).

Tab. 9. N – terminální adresové sekvence hydrogenosomálních proteinů.

Trojúhelníčky značí místa odštěpení adresových sekvencí. Místo odštěpení proteinů Tvh22 a Tvh47 bylo předpovězeno programem PSORT II.

Upraveno podle Bradleyho *et al.*, 1997.

hydrogenosomální protein	adresová sekvence
Tvh22	MLASVNTSRF ▼ FARL (PSORT II)
Tvh47	MLAAYGHRF ▼ QTKF (PSORT II)
ferredoxin	MLSQVCRF ▼ GTIT
β –sukcinyl–CoA–syntetáza 1	MLSASSNFARN ▼ FNIL
α–sukcinyl–CoA–syntetáza 1	MLAGDFSRN ▼ LKOP
pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza 1	MLRNF ▼ SKRV
jablečný enzym 1	MLTSSVSVVVRN ▼ ICRA

Přesné místo odštěpení adresových sekvencí podjednotek Tvh22 a Tvh47 jsem se pokusila ověřit experimentálně. Odštěpení mitochondriálních adresových sekvencí lze pozorovat jako změnu mobility proteinů pomocí SDS - PAGE a imunoblotingu. U podjednotek hydrogenosomálního komplexu I jsou však adresové sekvence příliš krátké (cca 10 aminokyselin) ve srovnání s celkovou délkou proteinu, takže změna mobility je málo patrná. Proto jsme zvolili přesnější metodu spočívající v izolaci podjednotek komplexu I z hydrogenosomů trichomonád kapalinovou chromatografií a sekvenací N–koncových aminokyselin.

Frakce purifikace komplexu I na hydroxyapatitu s NDH aktivitou (viz. 5.2.6.1., cca. 2000 μ l) byly smíchány a zahuštěny filtrem Amicon Ultra – 4 (Millipore) na konečný objem 200 μ l, rozděleny na 12% SDS – PAGE a přeneseny na PVDF membránu. PVDF membrána obarvená roztokem barvy Coomasie Brilliant Blue byla odeslána k sekvenaci N – terminálních aminokyselin (Zdeněk Voburka, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd, Praha). Výsledek sekvenace ukázal, že obě podjednotky jsou po svém transportu do hydrogenosomů procesovány. U podjednotky Tvh22 dochází k odštěpení 11 aminokyselin, a to tak, že se arginin nachází v pozici –3 od místa štěpení. U podjednotky Tvh47 se odštěpuje 9 aminokyselin s argininem v pozici –2 od místa štěpení (obr. 45). Tyto výsledky ukazují, že k odštěpení adresové sekvence podjednotky Tvh47 dochází v místě

predikovaném programem PSORT II, zatímco u podjednotky Tvh22 je adresová sekvence o jednu aminokyselinu delší, než navrhl tento program.

Obr. 45. Identifikace místa štěpení N-terminální adresové sekvence proteinů Tvh22 a Tvh47.

Místo štěpení bylo zjištěno N-terminální sekvenací podjednotek Tvh22 a Tvh47 izolovaných z hydrogenosomů *T. vaginalis*. Přerušovanou čarou jsou podtržené adresové sekvence, místa jejich odštěpení jsou značené trojúhelníčky. Celistvou čarou jsou podtržené N-koncové aminokyseliny identifikované sekvenací.

Tvh22: MLASVNTSRFF ▼ ARLNKKSVLIQKDF.....

Tvh47: MLAAYGHRF ▼ QTKFLDPKDRIFPNLF.....

6. Diskuze

V diplomové práci jsem se zabývala studiem komplexu I dýchacího řetězce, který byl nalezen u amitochondriálního anaerobního parazita *Trichomonas vaginalis*. Mými cíli bylo zjistit buněčnou lokalizaci dvou podjednotek katalytického modulu komplexu I Tvh22 a Tvh47 a zjistit místa odštěpení adresových sekvencí těchto proteinů. Dále jsem se pokusila zjistit celkový počet podjednotek a proteinových partnerů tohoto komplexu u *T. vaginalis* a jejich buněčnou lokalizaci. K tomuto účelu jsem se pokusila zavést některé nové techniky, a to BN – PAGE a afinitní purifikaci rekombinantních proteinů produkovaných trichomonádami.

Komplex I u anaerobního organismu *T. vaginalis*:

Přítomnost podjednotek komplexu I u anaerobního amitochondriálního prvoka *T. vaginalis* je velmi překvapivá, protože u těchto organismů jsou mitochondrie nahrazeny specifickými organelami - hydrogenosomy.

Komplex I je největší bílkovinnou složkou mitochondriální membrány. Je tvořen třemi doménami: (1) katalytickým modulem zodpovědným za oxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$ a tvořeným podjednotkami o velikostech 51-, 24-, 9- a 75 kDa; (2) membránovým modulem sloužícím k translokaci protonů a tvořeným více podjednotkami; (3) segmentem spojujícím dva předchozí moduly, tvořeným podjednotkami o velikostech 49-, 30-, 20- (PSST) a 23 kDa (TYKY). Tento modul je zodpovědný za vedení elektronů a vazbu ubichinonu (Yano, 2002).

U *T. vaginalis* byly identifikovány podjednotky homologní mitochondriálním podjednotkám 51 kDa (Tvh47) a 24 kDa (Tvh22), které tvoří součást katalytické flavoproteinové komponenty mitochondriálního komplexu I. Podařilo se mi jednoznačně prokázat, že obě podjednotky jsou lokalizované v hydrogenosomech.

Další dvě podjednotky katalytické domény mitochondriálního komplexu I o velikostech 7- a 74 kDa nebyly u trichomonád identifikovány. N-terminální část 74 kDa podjednotky je však podobná hydrogenosomální Fe -hydrogenáze o relativní molekulové hmotnosti 64 kDa (Dyall *et al.*, 2004). Oba proteiny obsahují na N – koncích stejnou sadu cysteinových motivů koordinujících 4Fe4S a 2Fe2S centra, liší se však svými karboxylovými konci.

Čtyři potenciální podjednotky komplexu I u *T. vaginalis*, nalezené v předběžných anotacích genomového projektu TIGR, by mohly být součástí

membránového modulu tohoto komplexu. Sekvenční podobnost těchto proteinů s mitochondriálními homology ND1, ND2, ND4 a ND6 je poměrně nízká, jsou to však proteiny vysoce hydrofobní, které obsahují podobné transmembránové domény. Jednotlivé homology se sice liší počtem transmembránových domén, to je však obvyklé u membránových podjednotek různých organismů. Bohužel se mi nepodařilo prokázat jejich buněčnou lokalizaci, což může být způsobeno narušením funkce membrán proteinovými produkty, takže se vyselektují pouze linie transformovaných trichomonád, které proteiny neprodukují, avšak jsou resistantní k selekci antibiotikem. Další vysvětlující možností je nedokonalá integrace proteinů podjednotek komplexu I do membrán spojená s následnou degradací těchto proteinů. Je také možné, že k expresi proteinů sice dochází, ale vzhledem k jejich vysoké hydrofobitě nejsou účinně rozděleny na SDS – PAGE. Tuto možnost bude třeba ověřit použitím elektroforézy s vhodnými tricinovými pufrů (Schägger, 2003).

Posledním modulem komplexu I u mitochondrií je spojovací segment. Geny pro podjednotky této části nebyly v genomovém projektu *T. vaginalis* nalezeny. Výsledky pokusů s použitím tří různých přístupů (1) afinitní chromatografie komplexu I značeného polyHis tagem, (2) purifikace na katexu monoS a hydroxyapatitu a (3) izolace komplexů pomocí BN – PAGE také ukazují, že se u trichomonád tento segment nenachází. Je tedy pravděpodobné, že katalytický modul komplexu I není u *T. vaginalis* propojen s membránovým modulem a proteiny těchto segmentů mají samostatné funkce.

Adresové sekvence podjednotek Tvh22 a Tvh47:

Hydrogenosomální proteiny obsahují na svých N – koncích adresové sekvence. Tyto sekvence jsou bohaté na hydrofóbní a hydroxylované aminokyseliny a mohou tvořit amfifilní α – helixy. Většina adresových sekvencí zkoumaných hydrogenosomálních proteinů (92%) obsahuje motiv methionin – leucin a přibližně 50% sekvencí začíná motivem methionin – leucin – serin (Bradley et al., 1997). Adresové sekvence podjednotek Tvh22 a Tvh47 začínají motivem methionin – leucin – alanin, podjednotka Tvh22 obsahuje ve své adresové sekvenci také dva seriny. Po translokaci do organel jsou N-terminální adresové sekvence odštěpeny. U trichomonád byly nalezeny homology β - podjednotky procesovací metalopeptidázy, zodpovědné za odštěpení adresových sekvencí (Doležal et al., 2005).

Syntéza hydrogenosomálních proteinů v cytoplasmě, jejich cílení pomocí N-terminálních adresových sekvencí a jejich procesování v hydrogenosomech svědčí o tom, že biogeneze hydrogenosomů probíhá podobně jako biogeneze mitochondrií (Bradley et al., 1997). Zjištění přesného místa odštěpení hydrogenosomálních adresových sekvencí je rovněž důležité pro další pokusy, kdy bychom chtěli produkovat enzymaticky aktivní rekombinantní podjednotky v bakteriích.

Funkce komplexu I u *Trichomonas vaginalis*:

Stejně jako NADH dehydrogenáza v mitochondriích redukuje purifikovaný enzym *T. vaginalis* spektrum elektronových přenašečů včetně ubichinonu. Oproti mitochondriálnímu enzymu je však schopen redukovat i [2Fe-2S] feredoxin, elektronový přenašeč využívaný u trichomonád při produkci vodíku. Kinetická data ukazují, že feredoxin je přirozeným akceptorem elektronů katalytického modulu komplexu I u *T. vaginalis* (Hrdý et al., 2004). Komplex I v hydrogenosomech tedy funguje jako NADH : feredoxin oxidoreduktáza a zajišťuje reoxidaci NADH, které přenáší elektrony uvolňované jablečným enzymem z malátu při jeho přeměně na pyruvát. Elektrony jsou dále předávány hydrogenázou na protony za vzniku molekulového vodíku. Je rovněž možné, že hydrogenosomální komplex I může předávat elektrony přímo na 64 kDa hydrogenázu (Hrdý et al., 2004). Tuto hypotézu je však třeba experimentálně ověřit.

V nedávné době bylo zjištěno, že elektrony přenášené výše popsaným transportním řetězcem mohou být zodpovědné také za alternativní cestu aktivace metronidazolu (5-nitroimidazol), který je jediným lékem dostupným k léčení urogenitální trichomonózy. Klasická cesta aktivace metronidazolu na cytotoxické anionové radikály využívá elektrony uvolněné z pyruvátu aktivitou pyruvát : feredoxin oxidoreduktázy (PFOR), které jsou předané feredoxinem na metronidazol. Trichomonády postrádající tuto cestu aktivace metronidazolu jsou však stále na působení metronidazolu citlivé. Kompletní resistance k vysokým dávkám metronidazolu se u *T. vaginalis* rozvíjí až poté, co je zablokována exprese PFOR a zároveň jablečného enzymu (Hrdý et al., 2005).

Proteinoví partneři komplexu I u *T. vaginalis*:

Komplex I je u *T. vaginalis* zapojen do hydrogenosomálního mechanismu transportu elektronů. Předchozí výsledky Sabriny Dyll s použitím metody „cross – linkingu“ (Dyall *et al.*, 2004b) naznačují, že podjednotky komplexu I tvoří superkomplex s jablečným enzymem a pyruvát : feredoxin oxidoreduktázou. Mé výsledky ale tuto hypotézu nepotvrdily: (1) při použití afinitní chromatografie byl společně s rekombinantní podjednotkou Tvh47-His purifikován také jablečný enzym, kontrolní purifikace však ukázala, že se tento enzym váže samostatně na niklovou kolonu a nekopurifikuje s podjednotkou Tvh47-His specificky, (2) imunoblotingová analýza hydrogenosomálních proteinových komplexů separovaných pomocí BN – PAGE ukázala, že jablečný enzym je přítomen v komplexech o relativních molekulových hmotnostech cca. 400- a 230 kDa, zatímco podjednotky Tvh22 a Tvh47 tvoří komplex o celkové molekulové hmotnosti cca. 70 kD, (3) komplex I purifikovaný na katexu monoS a keramickém hydroxyapatitu je tvořen pouze podjednotkami Tvh22 a Tvh47, (4) pyruvát : feredoxin oxidoreduktáza s podjednotkou Tvh47 na afinitní chromatografii nekopurifikuje.

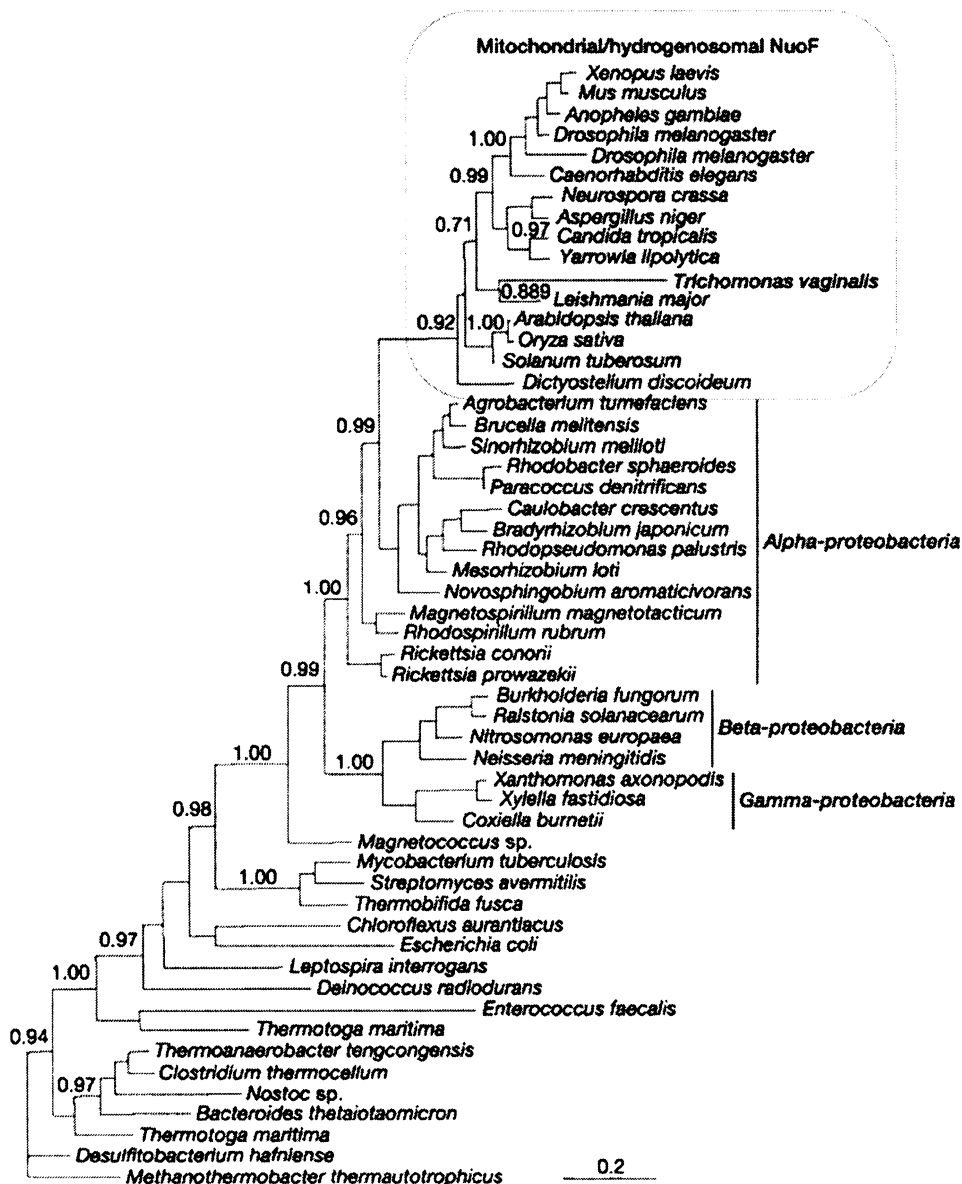
Evoluce komplexu I:

Zjištění, že hydrogenosomy *T. vaginalis* obsahují podjednotky komplexu I je v souladu s názorem, že hydrogenosomy mají stejný evoluční původ s mitochondrií. V současné době jsou přijímány především tři hypotézy: (1) hydrogenosomy a mitochondrie sdílí stejného předka, (2) hydrogenosomy vznikly z mitochondrie jejím přizpůsobením anaerobním podmínkám prostředí, (3) hydrogenosomy vznikly z anaerobní bakterie nezávisle na mitochondriích (Dyall *et al.*, 2004a). Naše výsledky svědčí spíše pro druhou variantu, kdy během divergence došlo k redukci katalytického a spojovacího modulu a změně funkce modulu membránového. Teorii společného evolučního původu hydrogenosomů a mitochondrií potvrzuje také fylogenetická analýza podjednotky Tvh47, která tento protein umístila mezi mitochondriální enzymy (obr. 46, Hrdý *et al.*, 2004).

Obr. 46. Fylogenetická analýza podjednotky Tvh47

Aminokyselinová sekvence proteinů byla zakódovaná do šesti skupin podle fyzikálních a biochemických vlastností jednotlivých aminokyselin („Dayhoff groups“). Takto upravené sekvence byly použity pro tvorbu fylogenetického stromu programem MrBayes. Analýza umístila podjednotku Tvh47 komplexu I *T. vaginalis* mezi mitochondriální geny.

Převzato z Hrdého *et al.*, 2004



Zavedení nových metod pro separaci hydrogenosomálních proteinů:

Pro separaci proteinových komplexů v nativním stavu se mi podařilo zavést metodu BN – PAGE. Touto metodou je možné izolovat 6 hydrogenosomálních komplexů, jejichž podjednotkové složení a porovnání s komplexy separovanými metodou BN-PAGE z mitochondrie budou předmětem dalších studií.

Pro produkci rekombinantních proteinů a jejich purifikaci z trichomonád jsem použila afinitní chromatografii His – tagovaných proteinů na niklové koloně. Výhodou této metody je nízká cena, nevýhodou nízké výtěžky proteinů značených polyhistidinovým tagem. Výhodnější metodou by mohl být systém založený na značení proteinů streptavidinovým tagem. Takto tagované proteiny jsou v trichomonádách produkovány v dostatečném množství (Tamara Smutná, nepublikovaná data), úspěšnost jejich purifikace z trichomonád však ještě nebyla vyzkoušena. Pokud by se tento systém podařilo zavést, trichomonády by mohly být použity pro produkci různých rekombinantních proteinů, které vyžadují specifické procesování za anaerobních podmínek.

7. Závěr

Přítomnost komplexu I (NADH dehydrogenázy) mitochondriálního dýchacího řetězce u amitochondriálního prvoka *Trichomonas vaginalis* je jedním z nejvýznamnějších důkazů, že hydrogenosomy a mitochondrie sdílí společný evoluční původ (viz. příloha publikace Hrdý *et al.*, ve které byla část výsledků této diplomové práce zveřejněna).

Komplex I je u trichomonád tvořen dvěma podjednotkami, které jsou homologní mitochondriálním podjednotkám o velikosti 24 kDa a 51 kDa katalytické domény. Tyto podjednotky, pojmenované Tvh22 (24 kDa) a Tvh47 (51 kDa) jsou lokalizované v hydrogenosomech a obsahují na svých N – koncích adresové sekvence, které jsou po translokaci proteinů do této organely odštěpeny.

Další potenciální podjednotky komplexu I byly nalezeny v genomovém projektu *T. vaginalis*. Jedná se o homology membránových podjednotek o velikostech 64 kDa (podjednotka TvhND1), 54 kDa (podjednotka TvhND2), 56 kDa (podjednotka TvhND4) a 43 kDa (podjednotka TvhND6). Jejich buněčnou lokalizaci se však nepodařilo prokázat. Podjednotky s homologií k podjednotkám mitochondriálního spojovacího segmentu nebyly u trichomonád nalezeny.

Pro další zkoumání hydrogenosomálních proteinových komplexů je přínosem zavedení metody Blue Native PAGE, která umožňuje separaci hydrogenosomálních proteinových komplexů. Podařilo se mi izolovat šest různých komplexů, z nichž byly dosud identifikovány dva, a to komplex I (NADH dehydrogenáza) a homodimer ferredoxin : oxygen oxidoreduktázy. V komplexech o velikosti cca. 230- a 400 kDa byla prokázána přítomnost jablečného enzymu.

8. Seznam literatury

Ahlers P.M., Zwicker K., Kerscher S., Brandt U.; 2000: Function of conserved acidic residues in the PSST homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*; The Journal Of Biological Chemistry; Vol. 275; Issue 31; pp. 23577-23582

Akhmanova A., Voncken F., van Alen T., van Hoek A., Boxma B., Vogels G., Veenhuis M., Hackstein J. H. P.; 1998: A hydrogenosome with a genome; Nature; Vol. 396; pp. 527 - 528

Albracht S. P., van Verseveld H. W., Hagen W. R., Kalkman M. L.; 1980: A comparison of the respiratory chain in particles from *Paracoccus denitrificans* and bovine heart mitochondria by EPR spectroscopy; Biochimica et Biophysica Acta; Vol. 593; pp. 173-186

Aleem M. I., Lees H.; 1963: Autotrophic enzyme systems. I. Electron transport systems concerned with hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas*; Can J Biochem Physiol; Vol. 41; pp. 763-778

Arizmendi J. M., Runswick M. J., Skehel J. M., Walker J. E.; 1992: NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. A fourth nuclear encoded subunit with a homologue encoded in chloroplast genomes; FEBS Letters; Vol. 301; Issue 3; pp. 237-324

Bayer M., Walter K., Simon H.; 1996: Purification and partial characterization of a reversible artificial mediator accepting NADH oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum*; European Journal of Biochemistry.; Vol. 239; pp. 686 - 691

Benchimol M., de Souza W.; 1983: Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*; Journal of Protozoology; Vol. 30; pp. 422 - 425

Benchimol M., Elias C. A., de Souza W.; 1982: *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome; Experimental Parasitology; Vol. 54; pp. 277 - 284

Benchimol M., Johnson P. J., de Souza W.; 1996: Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study; Biology of the Cell; Vol. 87; pp. 197 – 205

Bradley P. J., Lahti C. J., Plümper E., Johnson P. J.; 1997: Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosomes of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import; EMBO; Vol. 16; pp. 3484 - 3493

Brown D.M., Upcroft J.A., Dodd H.N., Chen N., Upcroft P.; 1999: Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*; Molecular and Biochemical Parasitology; Vol. 98; Issue 2; pp. 203 - 214

Brown M. D., Trounce I. A., Jun A. S., Allen J. C., Wallace D. C.; 2000: Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation; The Journal Of Biological Chemistry; Vol. 275; Issue 51; pp. 39831-39836

Bui E. T. N., Bradley P. J., Johnson P. J.; 1996: A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes; Proceedings of National Academy of Science of the United States of America; Vol. 93; pp. 9651 - 9656

Calhoun M. W., Gennis R. B.; 1993: Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*; *Journal of Bacteriology*; Vol. 175; pp. 3013-3019

Calhoun M. W., Oden K. L., Gennis R. B., de Mattos M. J., Neijssel O. M.; 1993: Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain; *Journal of Bacteriology*; Vol. 175; pp. 3020-3025

Cardol P., Matagne R.F., Remacle C.; 2002: Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme; *Journal of Molecular Biology*; Vol. 319; pp. 1211 - 1221

Carelli V., Ghelli A., Ratta M., Bacchilega E., Sangiorgi S., Mancini R., Leuzzi V., Cortelli P., Montagna P., Lugaresi E., Degli Esposti M.; 1997: Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype; *Neurology*; Vol. 48; pp. 1623–1632

Cohen, J; 2000: HIV transmission – AIDS researchers look to Africa for new insights; *Science*; Vol.287; pp 942

Darrouzet E., Dupuis A.; 1997: Genetic evidence for the existence of two quinone related inhibitor binding sites in NADH-CoQ reductase; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*; Vol. 1319; Issue 1; pp. 1-137

de Vries S., van Witzenburg R., Grivell L. A., Marres C. A. M.; 1992: Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*; *European Journal Of Biochemistry*; Vol. 203; Issue 3; pp. 587-592

Degli Esposti M., Carelli V., Ghelli A., Ratta M., Crimi M., Sangiorgi S., Montagna P., Lenaz G., Lugaresi E., Cortelli P.; 1994: Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy; *FEBS Letters*; Vol. 352; Issue 3; pp. 375-379

Degli Esposti M., Ngo A., McMullen G. L., Ghelli A., Sparla F., Benelli B., Ratta M., Linnane A. W.; 1996: The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones; *The Biochemical Journal*; Vol. 313; pp. 327-334

Degli Esposti M.; 1998: Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*; Vol. 1364; Issue 2; pp. 89-296

Djafarzadeh R., Kerscher S., Zwicker K., Radermacher M., Lindahl M., Schagger H., Brandt U.; 2000: Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1459; pp. 230-238

Doležal P., Vaňáčová Š., Tachezy J., Hrdý I.; 2004: Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins; *Gene*; Vol. 329; pp. 81 – 92

Doležal P., Šmíd O., Rada P., Zubáčová Z., Bursac D., Šuťák R., Nebesárová J., Lithgow T., Tachezy J.; 2005: Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting; *Proc Natl Acad Sci USA*; Vol. 102 (31); pp. 10924-10929.

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*; Vol. 83; pp. 221 - 234

Dupuis A., Prieur I., Lunardi J.; 2001: Toward a characterization of the connecting module of complex I; *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*; Vol. 33; pp. 159–168

Dupuis A., Skehel J. M., Walker J. E.; 1991: A homologue of a nuclear-coded iron-sulfur protein subunit of bovine mitochondrial complex I is encoded in chloroplast genomes; *Biochemistry*; Vol. 30; Issue 11; pp. 2954-2960

Dyall S. D., Johnson P.; 2000: Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis; *Current Opinion in Microbiology*; Vol. 3; Issue 4; pp. 404 – 411

Dyall S. D., Koehler C. M., Delgadillo-Correa M. H., Bradley P. J., Plümper E., Leuenberger D., Turck Ch. W., Johnson P. J.; 2000b: Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria; *Mol. Cell. Biol.*; Vol. 20; pp 2488 – 2497

Dyall S. D., Brown M. T. Johnson P.J; 2004a: Ancient invasions: from endosymbionts to organelles; *Science*; Vol 304; pp. 253-257.

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

Earley F. G., Ragan C. I.; 1984: Photoaffinity labelling of mitochondrial NADH dehydrogenase with arylazidoamorphigenin, an analogue of rotenone; *The Biochemical Journal*; Vol. 224; Issue 2; pp. 525-534

Earley F.G., Patel S.D., Ragan C.I., Attardi G.; 1987: Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3-H]-dehydrorotenone; *FEBS Letters*; Vol. 219; pp. 108–113

Eubel H., Braun H.-P., Millar A. H.; 2005: Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions; *Plant methods*, 1:11

Fang J., Beattie D. S.; 2002: Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization; *Biochemistry*; Vol. 41; pp. 3065 - 3072

Fang J., Wang Y., Beattie D. S.; 2001: Isolation and characterization of complex I, rotenone-sensitive NADH: ubiquinone oxidoreduktase, from the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*; *European Journal of Biochemistry*; Vol. 268; pp. 3075 - 3082

Fearnley I. M., Walker J. E.; 1992: Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*; Vol. 1140; Issue 2; pp. 105-214

Finel M., Skehel J. M., Albracht S. P., Fearnley I. M., Walker J. E.; 1992: Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme; *Biochemistry*; Vol. 31; Issue 46; pp. 11425-11434

Finel M.; 1998: Organization and evolution of structural elements within complex I; *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*; Vol. 1364; pp. 112–121

Friedrich T., Scheide D.; 2000: The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases; *FEBS Letters*; Vol. 479; pp. 1–5

Friedrich T., Scheide D.; 2000: The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases; *FEBS Letters*; Vol. 479; pp. 1–5

Friedrich T., van Heek P., Leif H., Ohnishi T., Forche E., Kunze B., Jansen R., Trowitzsch-Kienast W., Höfle G., Reichenbach H.; Weiss H.; 1994: Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I): relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose: ubiquinone oxidoreductase; *European Journal Of Biochemistry*; Vol. 219; Issue 1-2; pp. 691-698

Friedrich T., Weiss H.; 1997: Modular evolution of the respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules; *Journal of Theoretical Biology*; Vol. 187; Issue 4; pp. 453-629

Fry M.; Beesley J. E.; 1991: Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp; *Parasitology*; Vol. 102; pp. 17-26

Ginsburg H., Divo A. A., Geary T. G., Boland M. T., Jensen J. B.; 1986: Effect of mitochondrial inhibitors on intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in *in vitro* cultures; *Journal of Protozoology*; Vol. 33; pp. 121–125.

Hajduk S., Adler B., Bertrand K., Fearon K., Hager K., Hancock K., Harris M., Le Blanc A., Moore R., Pollard V., Priest J., Wood Z.; 1992: Molecular biology of African trypanosomes: development of new strategies to combat an old disease; *American Journal of Medical Science*; Vol. 303, 258-270.

Hatefi Y.; 1985: The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system; *Annual Review Of Biochemistry*; Vol. 54; pp. 1015-1069

Hiramatsu T., Kodama K., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.; 1998: A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*; *Journal Of Bacteriology*; Vol. 180; Issue 24; pp. 6642-6648

Holt P. J., Morgan D. J., Sazanov L. A.; 2003: The Location of NuoL and NuoM Subunits in the Membrane Domain of the *Escherichia coli* Complex I; *Journal of Biological Chemistry*; Vol. 278; Issue 44; pp. 43114-43120

Honigberg B. M., Volkmann D., Entzeroth R., Scholtyseck E.; 1984: A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donn  and *Tritrichomonas foetus* (Riedm ller); *Journal of Protozoology*; Vol. 31; pp. 116 – 131

Hrd  I., Hirt R. P., Dole al P., Bardo nov  L., Foster P. G., Tachezy J., Embley M. T.; 2004: *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I; *Nature*; Vol 432; pp. 618 – 621.

Hrd  I., Cammarc R., Stopka P., Kulda J., Tachezy J.; 2005: Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Vol. 49; pp. 5033-5036

Chinnery P.F., Brown D.T., Andrews R.M., Singh-Kler R., Riordan-Eva P., Lindley J., Applegarth D.A., Turnbull D.M., Howell N.; 2001: The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy; *Brain*; Vol. 124; pp. 209–218

Ito M., Guffanti A. A., Oudega B., Krulwich T. A.; 1999: mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na⁺ and in pH homeostasis; *Journal Of Bacteriology*; Vol. 181; Issue 8; pp. 2394-2402

Kagawa Y.; 1978: Reconstitution of the energy transformer, gate and channel subunit reassembly, crystalline ATPase and ATP synthesis; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 505; p. 45-93

Kashani-Poor N., Kerscher S., Zickermann V., Brandt U.; 2001: Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1504; pp. 363 - 370

Kashani-Poor N., Kerscher S., Zickermann V., Brandt U.; 2001: Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1504; pp. 363-370

Kerscher S. J., Okun J. G, Brandt U.; 1999: A single external enzyme confers alternative NADH: ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*; *Journal of Cell Science*; Vol. 112; pp. 2347 - 2354

Kerscher S., Dröse S., Zwicker K., Zickermann V., Brandt U.; 2002: *Yarrowia lipolytica* , a yeast genetic system to study mitochondrial complex 1; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1555; pp. 83 - 91

Kerscher S., Eschemann A., Okun P. M., Brandt U.; 2001: External alternative NADH: ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*; *Journal of Cell Science*; vol. 114; pp. 3915 - 3921

Kerscher S.; 2000: Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1459; pp. 274–283

Kikuno R., Miyata T.; 1985: Sequence homologies among mitochondrial DNA-coded URF2, URF4 and URF5; *FEBS Letters*; Vol. 189 Issue 1; pp. 85 - 88

Kita K., Hirawake H., Miyadera H., Amino H., Takeo S.; 2002: Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1553; pp. 123 - 139

Krungkrai J., Kanchanarithsak R., Krungkrai S. R., Rochanakij S.; 2002: Mitochondrial NADH dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*; *Experimental Parasitology*; Vol.100; pp. 54-61

Krungkrai J., Krungkrai S. R., Bhumiratana A.; 1993: *Plasmodium berghei*: Partial purification and characterization of the mitochondrial cytochrome c oxidase; *Experimental Parasitology*; Vol. 77; pp. 136–146

Krungkrai J.; 1995: Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1243; pp. 351–360

Krungkrai J.; 2000: Structure and function of mitochondria in human malarial pathogen *Plasmodium falciparum*; Trends in Comparative Biochemistry and Physiology; Vol. 6; pp. 95–107

Kulda J., Nohýnková E., Ludvík J.; 1986: Basic structure and function of the trichomonad cell; Acta Univ. Carolinae - Biologica; Vol. 30; pp. 181 – 198

Kulda J.; 1998: Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance; International Journal of Parasitology; Vol. 29; pp. 199 - 212

La Monica R. F., Marrs B. L.; 1976: The branched respiratory system of photosynthetically grown *Rhodopseudomonas capsulata*; Biochimica et Biophysica Acta; Vol. 423; pp. 431-439

Lagunas R.; 1986: Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast; Vol. 2; pp. 221-228

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; Vol. 46; pp. 307 – 310

Lahti C. J., Bradley P. J., Johnson P. J.; 1994: Molecular characterization of the α -subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase; Molecular and Biochemical Parasitology; Vol. 66; pp. 309-318

Land K. M., Delgadillo – Correa M. G., Tachezy J., Vaňáčová Š., Hsieh C. L., Štuřák R., Johnson P. J.; 2004: Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance; Molecular Microbiology; Vol. 51; pp. 115 - 122

Langreth S. G., Jensen J. B., Reese R. T., Trager W.; 1978: Fine structure of human malaria *in vitro*; Journal of Protozoology; Vol. 25; pp. 443–452

Leif H., Sled V. D., Ohnishi T., Weiss H., Friedrich T.; 1995: Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*; European Journal Of Biochemistry; Vol. 230; Issue 2; pp. 538-548

Leonard K., Haiker H., Weiss H.; 1987: Three-dimensional structure of NADH: ubiquinone reductase (complex I) from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals; Journal of Molecular Biology; Vol. 194; pp.277 - 286

Lill R., Nargang F. E., Neupert W.; 1996: Biogenesis of mitochondrial proteins; Current Biology; Vol. 8; pp. 505 - 512

Lill R., Neupert W.; 1996: Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane; Trends in Cell Biology; Vol. 6; pp. 56 - 61

Lindmark D. G., Müller M., Shio H.; 1975: Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*; Journal of Parasitology; Vol. 61; pp. 552 - 554

Lindmark D. G., Müller M.; 1973: Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism; Journal of Biological Chemistry; Vol. 248, pp. 7724 - 7728

Lindmark D. G., Müller M.; 1974: Biochemical cytology of trichomonad flagellates. II. Subcellular distribution of oxidoreductases and hydrolases in *Monocercomonas* sp.; Journal of Protozoology; Vol. 21; pp. 374 - 378

Lloyd D., Hillman K., Yarlett N., Müller M.; 1979: Respiration of *Tritrichomonas foetus*: absence of detectable cytochromes; Journal of Parasitology; Vol. 65; pp. 466 - 469

Luttik M. A. H., Overkamp K. M., Kötter P., de Vries S., van Dijken P. and Pronk J. T.; 1998: The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH; Journal of Biology and Chemistry; Vol. 273; pp. 24529-24534

Marres, C. A., de Vries S., Grivell L. A.; 1991: Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*; European Journal Of Biochemistry; Vol. 195; Issue 3; pp. 857-862

Matsushita K., Ohnishi T., Kaback H. R.; 1987: NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain; Biochemistry; Vol. 26; pp. 7732-7737

Matsushita K., Ohnishi T., Kaback H. R.; 1987: NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain; Biochemistry; Vol. 26; pp. 7732-7737

Meinhardt S. W., Wang D. C., Hon-nami K., Yagi T., Oshima T., Ohnishi T.; 1990: Studies on the NADH-menaquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in *Thermus thermophilus* HB-8; Journal of Biology and Chemistry; Vol. 265; pp. 1360-1368

Menz R. I., Day D. A.; 1996: Purification and characterization of 43- kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria; J. Biol. Chem.; Vol. 271; pp. 23117 - 23120

Miyoshi H.; 2001: Probing the ubiquinone reduction site in bovine mitochondrial complex I using a series of synthetic ubiquinones and inhibitors; Journal Of Bioenergetics And Biomembranes; Vol. 33; Issue 3; pp. 223-231

Müller M.; 1973: Biochemical cytology of trichomonad flagellates. I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*; Journal of Cell Biology; Vol. 57; pp. 453 - 474

Müller M.; 1993: The hydrogenosome; Journal of General Microbiology; Vol. 139; pp. 2879 - 2889

Müller M.; 1988: Energy metabolism of protozoa without mitochondria; Annual Review of Microbiology; Vol. 42; pp. 465 - 488

Ohnishi T.; 1998: Iron-sulfur clusters semiquinones in Complex I; Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics; Vol. 1364; pp. 186 - 206

Okun J.G., Lummen P., Brandt U.; 1999: Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase); The Journal Of Biological Chemistry; Vol. 274; Issue 5; pp. 2625-2630

Opperdoes F.R.; 1987: Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes; Annu. Rev. Microbiol.; Vol. 41; pp. 128-151

Paltauf F., Meingassner J. G.; 1982: The absence of cardiolipin in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*; Journal of Parasitology; Vol. 68; pp. 949 - 950

Pilkington S. J., Arizmendi J. M., Fearnley I. M., Runswick M. J., Skehel J. M., Walker J. E.; 1993: Structural organization of complex I from bovine mitochondria; Biochemical Society Transactions; Vol. 21; Issue 1; pp. 26-31

Prieur I., Lunardi J., Dupuis A.; 2001: Evidence for a quinone binding site close to the interface between NUOD and NUOB subunits of complex I; Biochimica et Biophysica Acta; Vol. 1504; pp. 173–178

Ragman C. I., Hatefi Y.; 1986: Isolation of the iron-sulfur-containing polypeptides of NADH: oxidoreductase ubiquinone; Methods of Enzymology; Vol. 126; pp. 360 - 369

Satoh T., Miyoshi H., Sakamoto K., Iwamura H.; 1996: Comparison of the inhibitory action of synthetic capsaicin analogs with various NADH-ubiquinone oxidoreductases; Biochimica et Biophysica; Vol. 1273; pp. 21 - 30

Sazanov L.A., Peak-Chew S.Y., Fearnley I.M., Walker J.E.; 2000; Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme; Biochemistry 39; pp. 7229–7235

Sazanov L.A., Walker J.E.; 2000: Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms; Journal of Molecular Biology; Vol. 302; pp. 455–464

Sherman I. W.; 1979: Biochemistry of *Plasmodium* (malaria parasites); Microbiological Review; Vol. 43; pp. 453–495

Schägger H.; 2003: SDS Electrophoresis Techniques; Membrane Protein Purification and crystallization 2/e: Practical Guide; Elsevier Science

Schuler F., Yano T., Di Bernardo S., Yagi T., Yankovskaya V., Singer T. P., Casida J. E.; 1999: NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone; Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America; Vol. 96; Issue 7; pp. 4149-4153

Schulte U.; 2001: Biogenesis of respiratory complex I; Journal Of Bioenergetics And Biomembranes; Vol. 33; Issue 3; pp. 205-212

Sled V. D., Friedrich T., Leif H., Weiss H., Meinhardt S. W., Fukumori Y., Calhoun M. W., Gennis R. B., Ohnishi T.; 1993: Bacterial NADH - Quinone Oxidoreductases: Iron - Sulfur Clusters and Related Problems; Journal of Bioenergetics and Biomembranes; Vol. 25; No.4; pp. 347 - 354

Small W. C., McAlister-Henn L.; 1998: Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*; Journal of Bacteriology; Vol. 180; pp. 4051-4055

Smeitink J., Sengers R., Trijbels F., Van den Heuvel L.; 2001: Human NADH: ubiquinone oxidoreductase; Journal of Bioenergetics and Biomembranes; Vol. 33; pp. 259 - 266

Soole K. L., Menz R. I.; 1995: Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria; *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; Vol. 27; pp. 397 - 406

Spiro S., Roberts R. E., Guest J. R.; 1989: FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression; *Molecular Microbiology*; Vol. 3; pp. 601-608

Steinbüchel A., Müller M.; 1986: Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes; *Molecular and Biochemical Parasitology*; Vol. 20; pp. 57 - 65

Steuber J., Schmid C., Rufibach M., Dimroth P.; 2000: Na⁺ translocation by complex I (NADH:quinone oxidoreductase) of *Escherichia coli*; *Molecular Microbiology*; Vol. 35; pp. 428-434

Takamiya S., Furushima R., Oya R. H.; 1984: Electron transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria: I. Characterization of NADH-cytochrome c reductase (complex I-III), with special reference to cytochrome localization; *Molecular and Biochemical Parasitology*; Vol. 13; pp. 121 - 134

Trumpower B. L.; 1990: Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms; *Microbiological Review*; Vol. 54; pp. 101-29

Uyemura S. A., Luo S., Moreno S. N. J., Docampo R.; 2000: Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria; *Journal of Biological Chemistry*; Vol. 275; pp. 9709–9715

Van Bruggen J. J. A., Stumm C. K., Vogels G. D.; 1983: Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropeleic protozoa; *Archives of Microbiology*; Vol. 136; pp. 89 - 95

Van der Giezen M., Slotboom D. J., Horner D. S., Dyal P. L., Harding M., Xue G.-P., Embley T. M., Kunji E. R. S.; 2002: Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: common origin for both organelles; *The EMBO Journal*; Vol. 21; No. 4; pp. 572 - 579

Van Herwerden L., Blair D., Agatsuma T.; 2000: Multiple Lineages of the Mitochondrial Gene NADH Dehydrogenase Subunit 1 (ND1) in Parasitic Helminths: Implications for Molecular Evolutionary Studies of Facultatively Anaerobic Eukaryotes; *Journal of Molecular Evolution*; Vol. 51, pp. 339 - 352

Videira A., Duarte M.; 2001: On complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria; *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*; Vol. 33; Issue 3; pp. 197-203

Voet D., Voetová J. G.; 1995: Transport elektronů a oxidační fosforylace; *Biochemie*; Victoria publishing, a.s.; 1. vydání; kap. 20; str. 590 - 624

Walker J. E.; 1992: The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains; *Quarterly Reviews Of Biophysics*; Vol. 25; Issue 3; pp. 253-324

Weidner U., Geier S., Ptock A., Friedrich T., Leif H, Weiss H.; 1993: The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I; *Journal of Molecular Biology*; Vol. 233; pp. 109-22

Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D.; 1991: The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria; *European Journal Of Biochemistry*; Vol. 197; Issue 3; pp. 563-576

Yagi T., Hon-nami K., Ohnishi T.; 1988: Purification and characterization of two types of NADH-quinone reductase from *Thermus thermophilus* HB-8; *Biochemistry*; Vol. 27; pp. 2008-2013

Yagi T.; 1986: Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*; *Arch. Biochem. Biophys*; Vol. 250; pp. 302-311

Yagi T.; 1990: Inhibition by capsaicin of NADH-quinone oxidoreductase is correlated with the presence of energy-coupling site 1 in various organisms; *Archives of Biochemistry and Biophysics*.; Vol. 281; pp. 305 - 311

Yagi T.; 1991: Bacterial NADH-quinone oxidoreductases; *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 23, pp. 211 - 225

Yano T., Magnitsky S., Sled V. D., Ohnishi T., Yagi T.; 1999: Characterization of the putative 2x[4Fe-4S]-binding NQO9 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*. Expression, reconstitution, and EPR characterization; *The Journal Of Biological Chemistry*; Vol. 274; Issue 40; pp. 28598-28605

Yano T.; 2002: The energy - transducing NADH: quinone oxidoreductase, complex 1; *Molecular Aspects of Medicine*; Vol. 23; pp. 345 - 368

Yarlett N., Orpin C. G., Munn E. A., unnn E. A., Yarlett N.C., Greenwood C. A.; 1986: Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*; *Biochem. J.*; Vol. 236; pp. 729 - 739

Yarlett N., Orpin C. G., Munn E. A., Yarlett N. C., Greenwood C. A.; 1986: Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*; *Biochemical Journal*; Vol. 236; pp. 729 - 739

Young I. G., Rogers B. L., Campbell H. D., Jaworowski A., Shaw D. C.; 1981: Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. UUG initiation codon; *European Journal of Biochemistry*; Vol. 116; pp. 165 – 170

9. Příloha

Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I

Ivan Hrdy¹, Robert P. Hirt², Pavel Dolezal¹, Lucie Bardonová¹, Peter G. Foster³, Jan Tachezy¹ & T. Martin Embley²

¹Department of Parasitology, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

²School of Biology, The Devonshire Building, The University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, UK

³Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK

Hydrogenosomes are double-membraned ATP-producing and hydrogen-producing organelles of diverse anaerobic eukaryotes¹. In some versions of endosymbiotic theory they are suggested to be homologues of mitochondria^{2–4}, but alternative views suggest they arose from an anaerobic bacterium that was distinct from the mitochondrial endosymbiont^{5,6}. Here we show that the 51-kDa and 24-kDa subunits of the NADH dehydrogenase module in complex I, the first step in the mitochondrial respiratory chain⁷, are active in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. Like mitochondrial NADH dehydrogenase, the purified *Trichomonas* enzyme can reduce a variety of electron carriers including ubiquinone, but unlike the mitochondrial enzyme it can also reduce ferredoxin, the electron carrier used¹ for hydrogen production. The presence of NADH dehydrogenase solves the long-standing conundrum of how hydrogenosomes regenerate NAD⁺ after malate oxidation. Phylogenetic analyses show that the *Trichomonas* 51-kDa homologue shares common ancestry with the mitochondrial enzyme. Recruitment of complex I subunits into a H₂-producing pathway provides evidence that mitochondria and hydrogenosomes are aerobic and anaerobic homologues of the same endosymbiotically derived organelle.

The evolutionary origins of *Trichomonas* hydrogenosomes remain debated because, unlike mitochondria or plastids, they lack an associated genome⁸. Because the phylogenetic position of *Trichomonas* is unresolved, its relationship to mitochondrion-bearing eukaryotic lineages is also unclear⁴. Characters suggesting that *Trichomonas* hydrogenosomes and mitochondria share a common origin include the surrounding double membrane, a common mode of division, similar overall physiology, common protein import pathways and conserved mechanisms of iron–sulphur-cluster assembly^{9–12}. However, *Trichomonas* hydrogenosomes also contain enzymes that are typically found in anaerobic bacteria¹, including pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and the iron [Fe]-hydrogenase that makes hydrogen. The presence of these enzymes, which are atypical for mitochondria, has recently⁶ been used to resurrect an old hypothesis⁵ for the origins of hydrogenosomes through symbioses involving anaerobic bacteria distinct from the mitochondrial endosymbiont.

We identified homologues in *Trichomonas vaginalis* of the mitochondrial 51-kDa (NuoF, named Tvh-47) and 24-kDa (NuoE, named Tvh-22) subunits of the catalytic flavoprotein component of mitochondrial complex I (Fig. 3). Complex I, also called NADH:ubiquinone oxidoreductase, is the first part of the mitochondrial respiratory chain⁷, so its presence in *Trichomonas*—which lacks cytochromes¹—was unexpected. Conceptual translation of both genes revealed that they preserve key functional residues⁷ (Fig. 3) and both contain putative leader sequences resembling those on proteins known to localize to the *Trichomonas* hydrogenosome¹³. Localization experiments on cell fractions with the use of a specific antibody raised against the recombinant *Trichomonas*

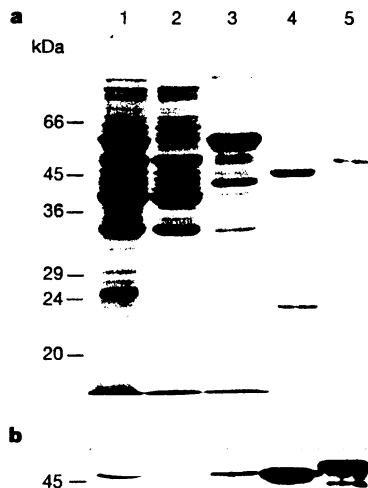


Figure 1 Localization of *Trichomonas* NADH dehydrogenase subunits. **a**, Coomassie-stained SDS–polyacrylamide-gel electrophoresis analysis of *Trichomonas* subcellular fractions: total homogenate (lane 1), cytosol (lane 2) and hydrogenosomes (lane 3). Lane 4, subunits of NADH dehydrogenase (Tvh-47 and Tvh-22 proteins (apparent molecular mass 47 and 23 kDa, respectively)) purified to homogeneity from *T. vaginalis* hydrogenosomes. Lane 5, recombinant Tvh-47 subunit (apparent molecular mass 54 kDa). **b**, Parallel analysis of the proteins by western blotting and the anti-Tvh-47 polyclonal antibody.

51-kDa homologue revealed that the protein is localized to the hydrogenosomal fraction (Fig. 1); this is confirmed by homologous transfection experiments demonstrating that Tvh-47 co-localizes with malic enzyme, a biochemical marker¹⁴ for the *Trichomonas* hydrogenosome (Fig. 2). Mass spectrometry of the active NADH dehydrogenase purified from *Trichomonas* hydrogenosomes confirmed the identity of the Tvh-47 and Tvh-22 proteins (Figs 1 and 3).

Uncovering the evolutionary origins of these *Trichomonas* pro-

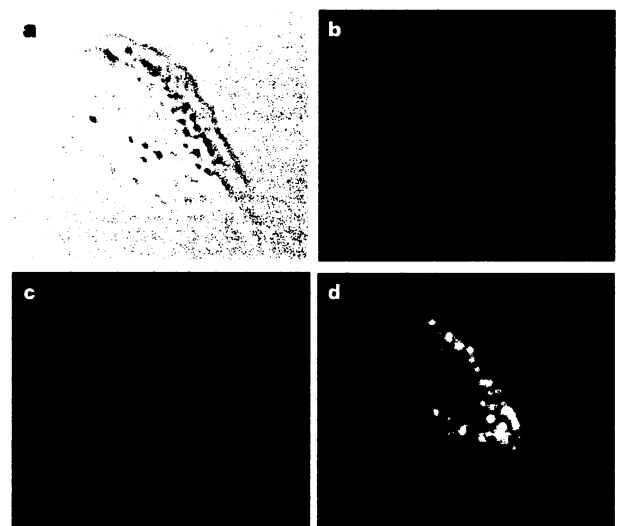


Figure 2 Localization of Tvh-47 within *Trichomonas* hydrogenosomes. **a**, Differential interference contrast image of a single transfected *Trichomonas vaginalis* cell. **b**, The same cell expressing an episomal plasmid containing Tvh-47 tagged with a carboxy-terminal haemagglutinin tag, probed with a mouse anti-haemagglutinin monoclonal antibody and Alexa Fluor-488 (green) donkey anti-mouse Ig. **c**, Localization of the hydrogenosomal marker protein malic enzyme, using rabbit anti-(malic enzyme) polyclonal antibody and Alexa Fluor-546 (red) donkey anti-rabbit Ig. **d**, Merge of **b** and **c** showing co-localization of the two proteins. The nucleus was stained blue with 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

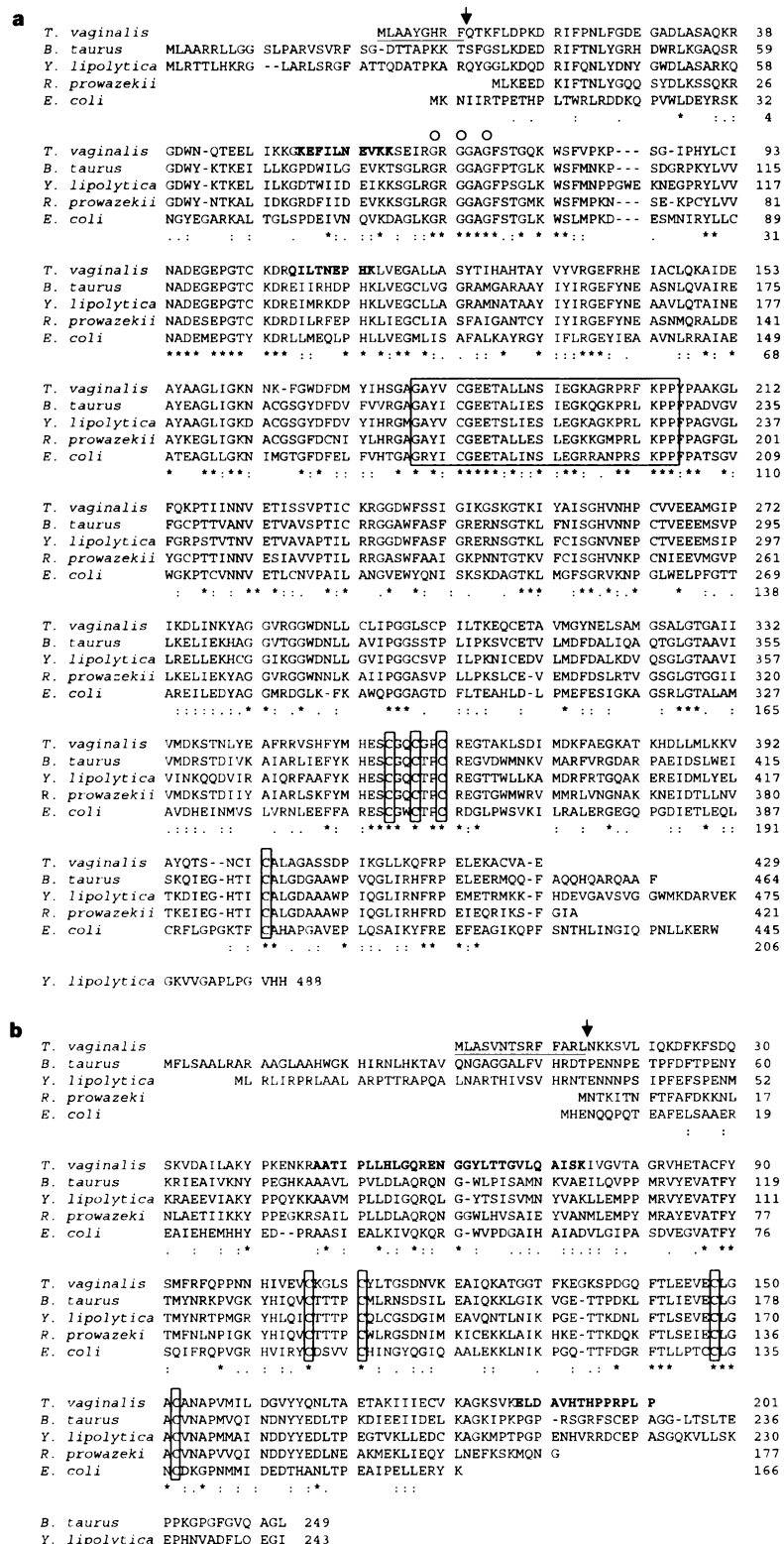


Figure 3 Sequences of NuoF and NuoE. **a**, Sequence alignment of *Trichomonas vaginalis* 47-kDa subunit of complex I (NuoF) with mitochondrial (*Bos taurus*, GenBank A39362; *Yarrowia lipolytica*, AAF65194) and eubacterial (*Rickettsia prowazekii*, NP_22050; *Escherichia coli*, NP_311195) homologues. Glycines of the NADH-binding motif GXGXGX₃G are indicated by open circles. The FMN-binding site (GA/MGAYV/ICGEERA/SLI/IE/NSL/IEG) and conserved cysteines motif coordinating the [4Fe-4S] cluster (CX₄CX₂CX₃₋₄₀C) are boxed. **b**, Sequence alignment of *T. vaginalis* 22-kDa subunit of complex I (NuoE) with mitochondrial (*Bos taurus*, B30113; *Yarrowia lipolytica*,

CAB65523) and eubacterial (*Rickettsia prowazekii*, NP_220737; *Escherichia coli*, NP_311196) homologues. Invariable cysteines coordinating the [2Fe-2S] cluster (CX₄CX₃₅₋₃₆CX₃C) are boxed. N-terminal pre-sequences of *T. vaginalis* subunits are underlined. An arrow indicates cleavage sites predicted by PSORT II (<http://psort.nibb.c.jp/>). Sequences obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization Q-TOF are in bold. Asterisks indicate fully conserved residues, colons strongly conserved residues, and full stops weakly conserved residues.

teins pushes phylogenetics to its limits because, like many parasite proteins, the *Trichomonas* proteins are divergent (Fig. 3). Tvh-22 was too poorly conserved and short to yield much insight into its origins, so we concentrated on the longer Tvh-47. Initial phylogenetic analyses of Tvh-47 and 51-kDa proteins, using a gamma-correction for site-rate variation and the empirical WAG matrix¹⁵, placed the *Trichomonas* sequence outside the mitochondrial and alpha-proteobacterial sequences. However, we also recovered alternative trees that placed the *Trichomonas* Tvh-47 protein within the mitochondrial clade that could not be rejected with the AU test¹⁶. Notably, the *Trichomonas* branch was much longer than the other branches in the tree and the Tvh-47 protein had a different amino acid composition from the other sequences, phenomena that are known to cause severe problems for phylogenetic analyses^{17,18}. To mitigate these phenomena we recoded each amino acid according to the six groups of chemically related amino acids that commonly replace one another^{15,19,20} and reanalysed the data. This recoding is related to transversion analysis and RY coding²¹ of DNA sequences, and like these methods had the effect of shortening long branches and homogenizing the amino acid composition between sequences. It also allowed us to estimate a general time-reversible

matrix specific to our data set. In these analyses, the best tree placed the *Trichomonas* Tvh-47 sequence within the mitochondrial clade (Fig. 4, Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 1). Thus, at the very least, our analyses cannot reject the hypothesis of a common origin for the *Trichomonas* and mitochondrial 51-kDa proteins, and the more sophisticated analysis prefers it.

Mitochondrial complex I catalyses the transfer of electrons from NADH to the lipid-soluble electron carrier ubiquinone in the respiratory chain⁷. The NADH dehydrogenase activity is associated with the 51-kDa and 24-kDa subunits of complex I. *Trichomonas* Tvh-47 and Tvh-22, which co-purify as an active heterodimeric enzyme from hydrogenosomes (Fig. 1, Supplementary Table 2), reduced, in an NADH-dependent manner, several electron carriers (Supplementary Table 3) including ubiquinone and *Trichomonas* 2Fe-2S ferredoxin. Kinetic data suggest that ferredoxin is the natural electron acceptor in the hydrogenosome (Supplementary Table 4). The *Trichomonas* enzyme is insensitive to rotenone, which blocks electron transfer in mitochondria by binding to complex I subunits that form the ubiquinone binding site; such units are missing from the *Trichomonas* enzyme.

The presence in *Trichomonas* hydrogenosomes of the NADH

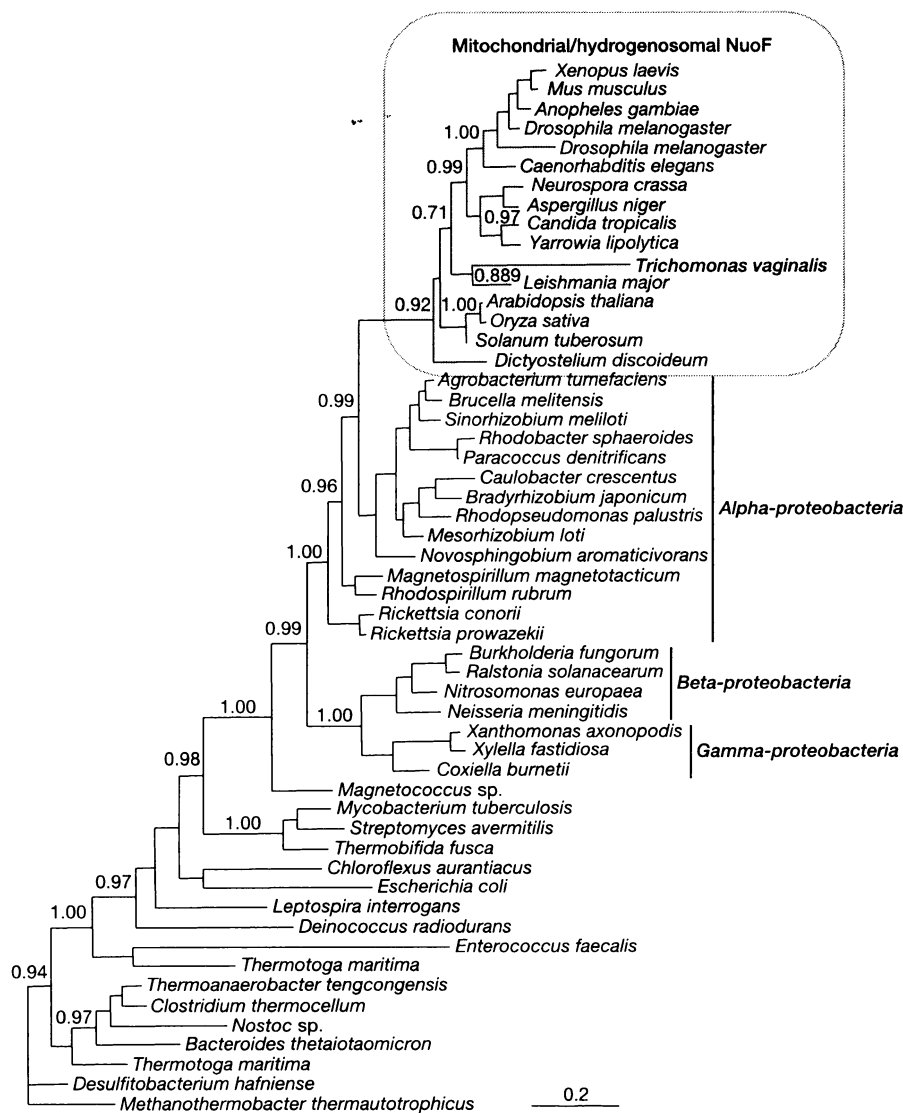


Figure 4 Phylogenetic analyses of Nuof homologues. Bayesian consensus tree of a general time-reversible substitution matrix estimated¹⁸ from amino acid sequences recoded into the six Dayhoff groups: ASTGP, DNEQ, RKH, MVIL, FYW and C¹⁹. Among-site rate heterogeneity was modelled by using a four-category gamma correction with a

fraction of invariant sites (pinvar). All parameters, including the composition and substitution rate matrix, were free, and the analysis used the Metropolis-coupled MCMC strategy from MrBayes²⁹. Posterior probabilities for selected branches are shown at nodes. Scale bar indicates number of changes per site.

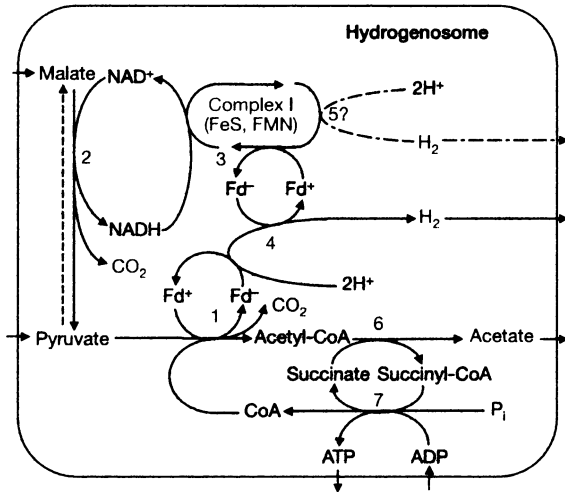


Figure 5 A schematic diagram illustrating the possible roles of NADH dehydrogenase from complex I in hydrogenosomal metabolism of *Trichomonas vaginalis*. Enzymes are indicated as follows: 1, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; 2, NAD-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating); 3, NADH:ferredoxin oxidoreductase activity of the 51-kDa (Tvh-47) and 24-kDa (Tvh-22) catalytic flavoprotein component of complex I; 4, ferredoxin-dependent Fe-hydrogenase; 5, hypothetical NAD-dependent 65-kDa Fe-hydrogenase; 6, acetate:succinate CoA-transferase; 7, succinate thiokinase.

dehydrogenase components from mitochondrial complex I fills important gaps in the redox balance of hydrogenosome metabolism^{22,23}. The enzyme can replenish the NAD⁺ pool by reoxidizing NADH produced by the hydrogenosomal malic enzyme (Fig. 5). It can also catalyse the previously elusive NADH:ferredoxin oxidoreductase activity, to provide an alternative source of reducing power to that provided by pyruvate:ferredoxin oxidoreductase¹. Its suspected interactions (Fig. 5) with the *Trichomonas* 65-kDa Fe-hydrogenase, which contains similar domains to the 75-kDa subunit of mitochondrial complex I (ref. 7) and to bacterial NAD-reducing hydrogenase²⁴, have yet to be demonstrated experimentally.

Our findings and previously published data⁹⁻¹² indicate that mitochondria and *Trichomonas* hydrogenosomes are homologues *sensu* Owen²⁵, meaning 'the same organ [here organelle] in different animals under every variety of form and function'. This hypothesis explains the shared similarities between the two organelles most simply and therefore is the one that must be rejected before alternative models are deemed necessary. Furthermore, the hypothesis⁶ that the *Trichomonas* hydrogenosome could be the product of a second invasion of eukaryotic cells by an anaerobic bacterium does not account for the observation, unless further invasions are posited, that hydrogenosomes also occur in fungi⁴ and diverse ciliate lineages²⁶. The 'atypical anaerobic metabolic enzymes', whose presence was used to underpin this hypothesis⁶, are also not unique to hydrogenosomes. A protein comprising a homologous pyruvate:ferredoxin oxidoreductase fused with NADPH-cytochrome P450 reductase occurs in *Euglena* mitochondria²⁷, and a homologous iron [Fe]-hydrogenase is found in the plastids of green algae and the cytosol of *Entamoeba* and *Giardia*⁴. By contrast, the presence of complex I components of mitochondrial ancestry in hydrogenosomes underscores their common endosymbiotic origin and uncovers a potential new route to hydrogen production in these anaerobic versions of mitochondria. □

Methods

Organisms, cultivation and cell fractionation

T. vaginalis strains T1 and G3 were maintained in Trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium with 10% heat-inactivated horse serum at 37 °C. Cytosolic and hydrogenosomal fractions were prepared as described¹⁰. Hydrogenosomes were isolated by isopycnic centrifugation on a 45% Percoll gradient¹⁰.

Identification of a NuoF-like gene in *T. vaginalis*

A clone identified in a *T. vaginalis* G3 EST library encoding a nearly complete 51-kDa subunit/NuoF homologue was used to isolate a full-length sequence (Tvh-47) from a *T. vaginalis* T1 λ ZAPII genomic library²⁸.

Additional components of complex I on the *T. vaginalis* genome

Published sequences of eukaryotic complex I subunits were used in tBlastn searches to identify a homologue of the 24-kDa subunit of complex I (NuoE) on the genome of *T. vaginalis* strain G3 (TIGR: <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>).

Phylogenetic analyses

The *Trichomonas* NuoF and NuoE amino-acid sequences were aligned to a broad sample of homologous sequences from the NCBI. Bayesian phylogenetic analyses used MrBayes 3.0B4 (ref. 29) for amino acid alignments, and p4 (ref. 18) for alignments of recoded amino acids. In the latter, the amino acids were recoded into six categories corresponding to the PAM matrix (and most other matrices) as follows: (1) ASTGP, (2) DNEQ, (3) RKH, (4) MVIL, (5) FYW and (6) C. This allowed the use of a 6 × 6 general time-reversible rate matrix with free parameters rather than a fixed empirical matrix, composition and among-site rate variation parameters were also free.

Recombinant protein and antibody preparation

The complete Tvh-47 plus an amino-terminal His tag was expressed in *Escherichia coli* and purified under denaturing conditions on Ni(II)-nitrilotriacetate resin (Qiagen). A rabbit polyclonal antibody was raised against the recombinant protein as described³⁰.

T. vaginalis transformation

The plasmid TagVag-47 was constructed by amplifying the Tvh-47 ORF and ligating it into pCR2.1-TOPO plasmid (Invitrogen). The di-haemagglutinin ((HA)₂) epitope tag was amplified from Tviscs2-(HA)₂ (ref. 10) and cloned into pCR2.1-TOPO. A fragment containing Tvh-47 and (HA)₂ was then subcloned into pAPLuc. The plasmid was digested by SacII-NdeI and the 5' untranslated region of AP65-1 was replaced by 340 base pairs of the 5' untranslated region of *T. vaginalis* α-succinyl CoA synthetase. *T. vaginalis* cells were electroporated and selected in TYM medium supplemented with G418 (Sigma)¹⁰.

Enzyme assays and purification of NADH dehydrogenase

For details of these procedures see Supplementary Information.

Recombinant ferredoxins

Recombinant *T. vaginalis* 2Fe-2S ferredoxin was produced as described¹⁰. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial 2Fe-2S ferredoxin, fused with a polyhistidine tag, was provided by A. Dancis (University of Pennsylvania).

Identification of peptides by mass spectrometry

Tryptic peptide fragments of purified NADH dehydrogenase subunits were sequenced by quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF) using an ULTIMA API nanospray mass spectrometer after separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography (CapLC; Waters).

Received 17 August; accepted 20 October 2004; doi:10.1038/nature03149.

- Müller, M. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2879–2889 (1993).
- Embley, T. M., Horner, D. S. & Hirt, R. P. Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? *Trends Ecol. Evol.* **12**, 437–441 (1997).
- Martin, W. & Müller, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37–41 (1998).
- Embley, T. M. et al. Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life* **55**, 387–395 (2003).
- Whately, J. M., John, P. & Whately, F. R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B* **204**, 165–187 (1979).
- Dyall, S. D., Brown, M. T. & Johnson, P. J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**, 253–257 (2004).
- Yano, T. The energy-transducing NADH: quinone oxidoreductase, complex I. *Mol. Aspects Med.* **23**, 345–368 (2002).
- Clemens, D. L. & Johnson, P. J. Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunofluorescence. *Mol. Biol. Parasitol.* **106**, 307–313 (2000).
- Benchimol, M., Johnson, P. J. & deSouza, W. Morphogenesis of the hydrogenosome: An ultrastructural study. *Biol. Cell* **87**, 197–205 (1996).
- Sutak, R. et al. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 10368–10373 (2004).
- Biagini, G. A., Finlay, B. J. & Lloyd, D. Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 133–140 (1997).
- Dyall, S. D. et al. Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2488–2497 (2000).
- Plummer, E., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. Implications of protein import on the origin of hydrogenosomes. *Protist* **149**, 303–311 (1998).
- Drumot, T. et al. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 221–234 (1996).
- Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691–699 (2001).
- Shimodaira, H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **51**, 492–508 (2002).
- Hendy, M. D. & Penny, D. A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.* **38**, 297–309 (1989).

18. Foster, P. G. Modeling compositional heterogeneity. *Syst. Biol.* **53**, 485–495 (2004).
19. Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. & Orcutt, B. C. in *Atlas of Protein Sequences and Structure* (ed. Dayhoff, M. O.) 345–352 (National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 1978).
20. Martin, W. *et al.* Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**, 162–165 (1998).
21. Delsuc, F., Phillips, M. J. & Penny, D. Comment on 'Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic?'. *Science* **301**, 1482–1483 (2003).
22. Steinbuechel, A. & Muller, M. Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**, 57–65 (1986).
23. Rasoloson, D. *et al.* Mechanisms of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology* **148**, 2467–2477 (2002).
24. Pilkington, S. J., Skehel, J. M., Gennis, R. B. & Walker, J. E. Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry* **30**, 2166–2175 (1991).
25. Owen, R. *Lectures on the Comparative Physiology of the Invertebrate Animals* (Longman, Brown, Green, Longmans, London, 1843).
26. Embley, T. M. *et al.* Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc. R. Soc. Lond. B* **262**, 87–93 (1995).
27. Rotte, C., Stejskal, F., Zhu, G., Keithly, J. S. & Martin, W. Pyruvate: NADP oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: A biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 710–720 (2001).
28. Tachezy, J., Sanchez, L. B. & Muller, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1919–1928 (2001).
29. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574 (2003).
30. Gaziova, I. & Lukes, J. Mitochondrial and nuclear localization of topoisomerase II in the flagellate *Bodo saltans* (Kinetoplastida), a species with non-catenated kinetoplast DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 10900–10907 (2003).

Supplementary Information accompanies the paper on www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank M. Hubalek for mass spectrometry and P. Dyal for technical support. Sequence data for *Trichomonas vaginalis* were obtained from The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>. Sequencing of *T. vaginalis* was accomplished with support from The National Institute of Allergy and Infectious Diseases. This work was supported by a Fogarty International Research Collaboration Award to J.T. and Miklos Muller and a grant from the Grant Agency of the Czech Republic to J.T. R.P.H. was supported by a Wellcome Trust University Award.

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.T. (tachezy@natur.cuni.cz) or T.M.E. (martin.embley@ncl.ac.uk). The sequences used in this paper have been deposited in the GenBank database under the accession numbers AY753550 and AY753551.

A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to Chlamydiae

Ilka Haferkamp¹, Stephan Schmitz-Esser², Nicole Linka¹, Claude Urbany¹, Astrid Collingro², Michael Wagner², Matthias Horn² & H. Ekkehard Neuhaus¹

¹Pflanzenphysiologie, Universität Kaiserslautern, D-67653 Kaiserslautern, Germany

²Abteilung Mikrobielle Ökologie, Institut für Ökologie und Naturschutz, Universität Wien, 1090 Wien, Austria

Bacteria living within eukaryotic cells can be essential for the survival or reproduction of the host^{1,2} but in other cases are among the most successful pathogens^{3,4}. Environmental Chlamydiae, including strain UWE25, thrive as obligate intracellular symbionts within protozoa; are recently discovered relatives of major bacterial pathogens of humans; and also infect human cells^{4–7}. Genome analysis of UWE25 predicted that this symbiont is unable to synthesize the universal electron carrier nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)⁷. Compensation of limited biosynthetic capacity in intracellular bacteria is usually achieved

by import of primary metabolites^{8–11}. Here, we report the identification of a candidate transporter protein from UWE25 that is highly specific for import of NAD⁺ when synthesized heterologously in *Escherichia coli*. The discovery of this candidate NAD⁺/ADP exchanger demonstrates that intact NAD⁺ molecules can be transported through cytoplasmic membranes. This protein acts together with a newly discovered nucleotide transporter and an ATP/ADP translocase¹², and allows UWE25 to exploit its host cell by means of a sophisticated metabolic parasitism.

The genome sequence of UWE25 (ref. 7) contains five genes (*ntt1* to *ntt5*) with sequence homology to functionally characterized ATP/ADP translocases or nucleotide transporters (NTT) of other bacteria¹³. It is tempting to speculate that these genes encode transporters essential for survival of UWE25 by linking symbiont and host metabolism. However, the specific properties of these putative transporters can not be predicted from sequence analyses¹⁴ but require heterologous expression in *E. coli*, leading to biochemical properties similar to the authentic carriers in their native membranes^{14–18}. Heterologous expression of NTT1 of UWE25 and its biochemical characterization demonstrated that this transporter is used for energy parasitism by enabling uptake of host cell ATP in exchange with ADP¹².

In order to investigate whether NTT-type carriers of UWE25 also compensate for lack of nucleotide and NAD⁺ biosynthesis, two further NTTs were functionally characterized in this study. NTT2 (516 amino acids) exhibits highest sequence identity (47%) to the ATP/ADP translocase CtNTT1 from *Chlamydia trachomatis*. NTT4 (431 amino acids) shows highest sequence identity (22%) to the plastidic ATP/ADP transporter AtNTT1 from *Arabidopsis thaliana*, exhibits nine predicted transmembrane domains, and lacks, in contrast to NTT2, several amino acid residues critical for nucleotide transport (Supplementary Fig. 1)¹⁹.

Heterologously synthesized NTT2 transports ATP, GTP and UTP at high rates, but ADP import is much lower. This transport is specific because uninduced *E. coli* cells do not import labelled compounds (Supplementary Fig. 2a). This import closely resembles the characteristics of CtNTT2, a unidirectional nucleotide transporter from *C. trachomatis*¹⁴. The functional similarity of CtNTT2 and NTT2 is interesting, because the amino acid sequence of NTT2 exhibits the highest similarity to the ATP/ADP translocase CtNTT1 rather than CtNTT2 (Supplementary Fig. 1). Moreover, phylogenetic analysis indicates a closer relationship of UWE25 NTT2 to ATP/ADP translocases than to the chlamydial nucleoside-triphosphat uniporters (Supplementary Fig. 3). This observation illustrates that it is impossible to make reliable predictions on the transport characteristics of NTT-type proteins solely on the basis of amino acid sequence identities.

Heterologous expression of NTT4 demonstrated that this transporter does not accept nucleoside triphosphates, but instead catalyses ADP uptake. Uptake of radioactively labelled nucleotides by NTT4 depends upon induction of the corresponding gene (Supplementary Fig. 2b). Such a clear substrate preference for a nucleoside diphosphate, rather than nucleoside triphosphates, is unusual and prompted further transport analyses in the presence of putative inhibitors. Notably, the presence of unlabelled NAD⁺ almost abolished [³²P]-ADP uptake, as did NADH and ADP, whereas NADP⁺ and NADPH inhibited [³²P]-ADP uptake only slightly (Fig. 1a).

In order to reveal the properties of NTT4 in more detail, we analysed the transport of [adenylate-³²P]-labelled NAD⁺. NTT4-expressing *E. coli* imported [³²P]-NAD⁺ at a rate of about 80 nmol mg⁻¹ of protein per hour, and the simultaneous presence of unlabelled NAD⁺ (fivefold excess) inhibited uptake to less than 20% of the control rate (Fig. 1b). A high substrate specificity of NTT4 is further underlined by the fact that the substrate acceptance is determined in various domains of the NAD⁺ molecule, as