

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lucie Krejbichová

Metabolismus železa u parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*
Iron metabolism of parasitic protist *Trypanosoma brucei*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne 1.6.2020

.....

Poděkování:

Mé velké díky patří školiteli RNDr. Janu Machovi, Ph.D, za jeho pomoc, trpělivost, cenné rady a konstruktivní kritiku, která pomohla dát této práci formu. Dále bych chtěla poděkovat lidem z týmu parazitologické laboratoře Příjmu a vnitrobuněčného metabolismu kovů, kteří mi pomohli vidět téma ve větším kontextu a poznat praktickou část laboratorních výzkumů. Nakonec nemohu zapomenout poděkovat své rodině, partnerovi a přátelům za jejich velkou podporu.

Abstrakt

Trypanosoma brucei je parazitický organismus, který se nejčastěji vyskytuje v oblasti subsaharské Afriky a způsobuje spavou nemoc u člověka a onemocnění u zvířat. Na svého definitivního savčího hostitele (člověka) je přenášen krevsajícími mouchami tse-tse (*Glossina*). Během svého složitého životního cyklu, kdy se vyskytuje v odlišných prostředích, prochází morfologickými a metabolickými změnami.

Železo je důležitým prvkem pro všechny živé organismy, a tedy i pro Trypanosomy. Vzhledem k tomu, že jsou Trypanosomy závislé na příjmu železa z hostitele či přenašeče, hraje tento kov roli ve vztahu mezi parazitem a jeho hostitelem. Trypanosomy využívají železo v metabolických dějích, ať už se jedná o energetický metabolismus, respiraci, syntézu nukleových kyselin, detoxifikaci a buněčnou homeostázu. Je důležitým prvkem esenciálních drah tvorby takzvaných železo-sírných klastrů, které fungují jako kofaktory řady enzymů figurujících ve výše zmíněných procesech. Pochopení metabolismu železa v buňce může pomoci při vývoji nových léčiv a příkladem mohou být takzvané železné chelátory.

Klíčová slova: *Trypanosoma brucei*, železo, metabolismus železa, proteiny obsahující železo, železo-sírné klastry

Abstract

Trypanosoma brucei is a parasite most frequently occurring in Sub-Saharan Africa that causes sleeping sickness in humans and various similar illnesses in animals. The bloodsucking tsetse flies (*Glossina*) transfer the parasite to humans, their final hosts. Throughout its complex life cycle, *Trypanosoma* occurs in different environments and undergoes various morphological and metabolic changes.

Iron is an important element for all living organisms, including *Trypanosoma*. The metal plays a crucial role in the host-parasite interaction since trypanosomes are dependent on the iron they acquire from the host or vector. Trypanosomes use iron in metabolic reactions, such as energy metabolism, respiration, nucleic acid synthesis, detoxification, and cellular homeostasis. It is an important element in the synthesis of iron-sulfur clusters which function as cofactors during the above-mentioned reactions. The understanding of iron metabolism in the cell can facilitate the development of new medicaments, an example being iron chelators.

Keywords: *Trypanosoma brucei*, iron, iron metabolism, metabolism, iron-containing proteins, iron-sulfur clusters

Obsah

1. ÚVOD	1
2. <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	3
2.1. Životní cyklus.....	3
2.2. Energetický metabolismus	4
2.2.1. Energetický metabolismus u DF	5
2.2.2. Energetický metabolismus u PS.....	6
3. METABOLISMUS ŽELEZA	10
3.1. Železo a jeho obecný význam	10
3.2. Železo a savčí hostitel	11
3.3. Příjem železa u Trypanosomy	12
3.4. Transport a homeostáza železa v buňce	13
3.4.1 Fe/S klastry	14
3.4.1.1. Mitochondriální dráha – ISC.....	15
3.4.1.2. Exportní dráha – ISC.....	18
3.4.1.3. Cytosolická dráha – CIA	18
3.4.2. Proteiny obsahující Fe/S klastry.....	19
3.4.3. Proteiny s jinak vázaným železem	20
3.4.4. Hem	22
3.4.5. Detoxifikace ROS	23
3.4.5.1. Acidokalcizómy	23
3.4.5.2 VIT 1	23
3.4.5.3. LIR 1	24
4. CHEMOTERAPEUTIKA.....	25
5. ZÁVĚR.....	27
6. LITERATURA.....	28

SEZNAM ZKRATEK

Acetyl-CoA - acetyl koenzym A	shock“ proteiny
ADP - adenosin difosfát	Mms19 – homologní protein nukleotidové opravné excize
ASCT - acetátový cyklus	MPP - mitochondriální procesující peptidáza
ATP - adenosin trifosfát	NAD - oxidovaný nikotinamidadenin dinukleotid
BolA – vázaný transkripční faktor	NADH - redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid
Cfd1/Nbp35 – NTP-ázový komplex	Nar1 – protein cytosolické dráhy Fe/S klastrů transportující syntetizovaný klastr do apoproteinu
CIA - cytosolická dráha železo-sírných klastrů	Nfs – cystein desulfuráza
CNS - centrální nervová soustava	Nfu1 – protein zprostředkovávající přesun [4Fe-4S] klastrů do apoproteinů
COX - cytochrom c oxidáza	NIF – dusík fixující dráha
CSD – cystein-(de)sulfinátová dráha	PS - procyklické stádium <i>T. brucei</i>
DF - dlouhá forma <i>T. brucei</i>	ROS – reaktivní kyslíkové radikály
DNICs - dinitrosylové komplexy	SLC25A – “solute carrier family“ protein
Dre2 – protein syntézy Fe/S klastrů	SOD - superoxid dismutáza
Erv1 - sulfhydryl oxidáza	Ssq - chaperon
ESAGs - geny asociující expresi	SUF – síru fixující dráha
Fdr - ferredoxin reduktáza	Tah18 - diflavin reduktáza
Fdx - ferredoxin	TAO - terminální alternativní oxidáza
GPO - glycerol-3-fosfát oxidáza	TbACO - trypanozomální akonitáza
Grx - glutaredoxin	TbHrg – histidinový glykoprotein, “heme responsive gene“
Hsp70 - chaperonový “heat shock“ protein	TbMLP – mukolipinový protein
Iba57 – transportní faktor	TCA - trikarboxylová kyselina
Ind1 - protein Fe/S klastrů podílející se na vzniku dýchacího komplexu I	Tf - transferrin
IRP1 - železo regulující protein	TfR- transferrinový receptor
ISC - mitochondriální dráha železo-sírných klastrů	TSH ₂ - dithiol trypanothion
ISCU - scaffold protein železo-sírných klastrů	VIT1 - vakuolární transportér železa
Isd11 – ISC protein interagující s desulfurázou	VSG - “variant surface glykoprotein“
Jac1 – co-chaperon	
LIP – “labile iron pool“, nestabilně vázané železo	
LIR1 - leishmaniový železo regulační protein	
MCP – monocytární chemoatraktický protein	
MFS - “major facilitator superfamily“	
Mge1 – chaperon, protein vázající “heat	

1. ÚVOD

Železo je důležitým prvkem pro všechny živé organismy (Kaplan et al., 2009). V případě parazitů hraje významnou roli ve vzájemném vztahu k hostiteli, příkladem mohou být právě parazitičtí prvoci rodu *Trypanosoma brucei*, patogenní agens způsobující trypanozomiázu či spavou nemoc u člověka a zvířat (Doherty, 2007). *T. brucei* je plně závislá na příjmu železa ze svého hostitele či jejího přenašeče mouchy tse-tse (Doherty, 2007). Během svého životního cyklu dochází k metabolickým i morfologickým adaptacím tohoto parazita na prostředí a tyto změny se odrážejí i na metabolismu železa. Nejvíce jsou tyto jevy prozkoumány u dvou stádií a to u savčího krevního stádia - DF (dlouhé štíhlé formy) a u hmyzího procyklického stádia - PS (Trindade et al., 2016).

Nároky na příjem železa jsou díky adaptacím na prostředí u obou forem rozdílné a probíhají jiným způsobem. DF přijímá menší množství železa než PS, vzhledem k tomu, že má redukovaný dýchací řetězec a celkový metabolismus., navíc využívá jen několik málo železo obsahujících enzymů: akonitázu, alternativní oxidázu, ribonukleotid reduktázu a superoxid dismutázu (Merschjohann et al., 2006).

Co se týká příjmu železa u PS, ví se o tomto ději zatím velmi málo. Díky plně funkčnímu dýchacímu řetězci a metabolismu, kde se na rozdíl od DF aktivněji zapojuje i mitochondrie, dochází k syntéze většího počtu enzymů, ale u některých z nich však není přesně popsána funkce (Verner et al., 2015).

V syntéze enzymových kofaktorů, takzvaných železo-sírných klastrů, má esenciální roli mitochondrie, a to u obou zkoumaných stádií. Jedná se totiž o životně důležitý děj všech živých organismů (Lill et al., 1999). V mitochondrii probíhá první část syntézy a to takzvaná mitochondriální ISC (iron-sulfur cluster) dráha, kde se inkorporují klastry do apoproteinů. V cytosolu probíhá CIA (cytosolic iron-sulfur cluster) dráha, která je však závislá na blíže nepopsaných síru a glutathion obsahujících komponentech (Srinivasan et al., 2014). Tyto produkty jsou dopraveny z mitochondrie takzvanou ISC exportní drahou, která propojuje ISC s CIA dráhou. Výsledkem těchto drah jsou enzymy obsahující železo-sírné klastry a příkladem mohou být: akonitáza, fumaráza, komplexy I a II dýchacího řetězce (Lill et al., 1999). Existují však i enzymy, ve kterých není železo vázáno ve formě klastrů, ale i tak jsou součástí různých dějů. Účastní se respirace (alternativní oxidáza), syntézy DNA (ribonukleotid reduktáza), metabolismu lipidů (stearoyl-CoA desaturáza), detoxifikace kyslíkových radikálů čili oxidativního stresu (superoxid dismutáza a dinitrosylové komplexy) (Manta et al., 2012). Zmínit by se daly i hemoproteiny, kde je železo součástí hemové skupiny. Hemem se však tato práce zabývá pouze okrajově.

Přestože je železo esenciální, může být v určitých stavech pro organismus toxické, avšak

u Trypanosom se neví mnoho o jeho redistribuci mezi organelami a detoxifikaci. Komplexní informace o metabolismu železa mohou přinést nové možnosti ve výzkumu medikamentů a příkladem mohou být chelátory železa, které jsou více toxické pro Trypanosomy než pro savčí buňky (Merschjohann et al., 2006).

Cílem této práce je shrnutí stávajících poznatků o metabolismu železa u *T. brucei*.

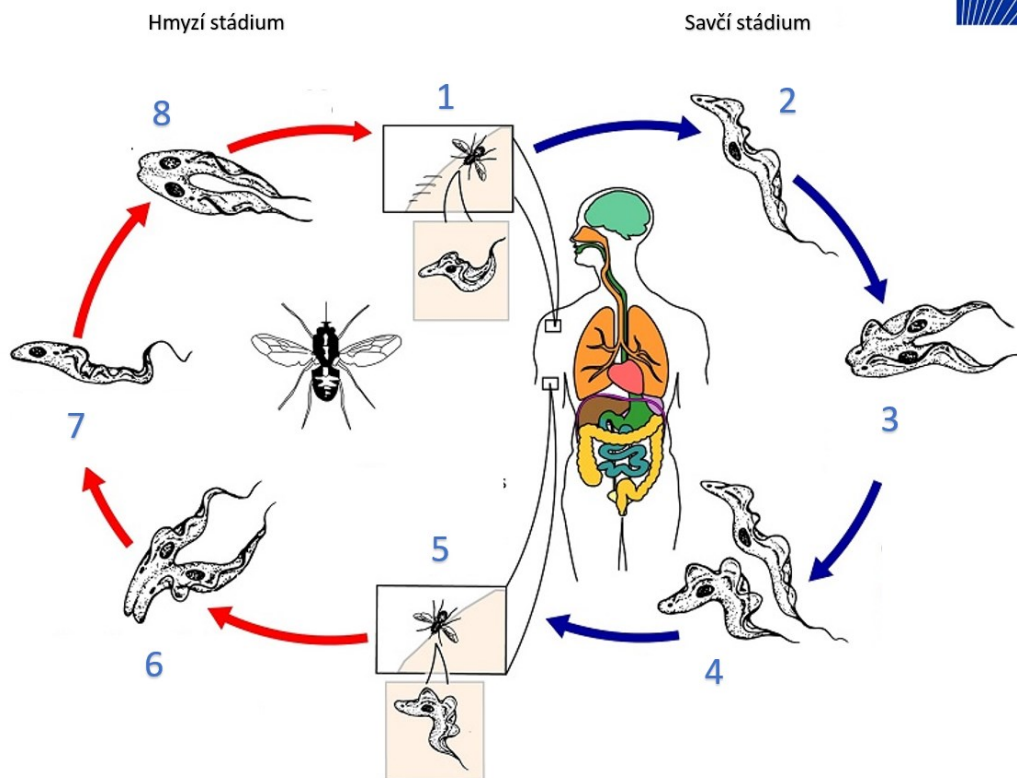
2. TRYPANOSOMA BRUCEI

Rod *Trypanosoma* se řadí do třídy *Kinetoplastida*, do tohoto rodu patří významní parazité člověka i zvířat, jako je například druh *Trypanosoma cruzi*, a také africké trypanosomy druhu *Trypanosoma brucei*. Z afrických trypanosom na člověku parazitují poddruhy *T. brucei gambiense*, a *T. brucei rhodensiense*, které způsobují onemocnění zvané trypanozomiáza, jejímž českým ekvivalentem je spavá nemoc. Trypanosomy napadající člověka ohrožují i zvířata, zatímco *T. brucei brucei* parazituje jen na volně žijících či domestikovaných zvířatech, u kterých způsobuje onemocnění zvané nagana. Mezi Trypanosomy, napadající zvířata, mohou být řazeny i *T. evansi* a *T. equiperdum*, které se nejspíš z *T. brucei* vyvinuly, přesné fylogenetické zařazení těchto druhů je však nadále nejisté (Lai et al., 2008). *T. brucei* prochází v průběhu onemocnění dvěma stádii: hemolymfatickým a meningoencefalitickým, pokud není nemoc léčena dochází ke kómatu a smrti (Malvy et al., 2011). Přestože tato skupina protistů, převážně pak *T. brucei gambiense* způsobující 98% případů lidského onemocnění, zapříčinila ve 20. století závažný zdravotní problém v chudé subsaharské Africe, dle WHO se však daří s lidskou spavou nemocí velmi úspěšně bojovat (WHO, 2020). Od 90. let se snížil počet nově nakažených osob o 95% případů, v roce 2017 bylo evidováno 1442 případů, a v roce 2018 se počet nakažených dostal na prozatímni historické minimum - 977 nových případů. Motivací WHO je úplné vymýcení nákazy do roku 2030 (WHO, 2019; WHO, 2020).

2.1. Životní cyklus

T. brucei prochází složitým životním cyklem. Do těla postiženého savce se dostává bodnutím mouchy tse-tse (*Glossina spp.*), která v životním cyklu figuruje jako vektor. V jejím střevě se parazit vyskytuje ve formě procyklického stádia (PS), které se v proventriculu hmyzu přeměňuje na epimastigota, a ten se dále ve slinných žlázách mění na metacyklické stádium čekající na kolonizaci hostitele. Ve svém savčím hostiteli se *Trypanosoma* vyskytuje ve dvou formách. V krevním řečišti se nachází tak zvaná dlouhá štíhlá forma (DF), která se následně přeměňuje na krátkou formu, a ta je konečně nasáta hmyzím vektorem. Vše se odehrává v extracelulárním prostředí (Fenn et al., 2007; Matthews, 2005).

Z hlediska morfologie můžeme krevní a hmyzí stádia bez jedné již zmíněné výjimky označit za trypomastigoty (Wheeler et al., 2019)



Obrázek 1: Životní cyklus Afrických Trypanozóm: 1) Metacyklické stádium (trypomastigot) je injektováno do hostitele, 2) Vstupuje přes lymfatický systém do krevního řečiště a mění se na dlouhou štíhlou formu (trypomastigot) a je roznesen po těle, 3) Binární dělení, 4) Přeměnění na krátkou stumpy formu (trypomastigot), 5) Nasátí vektorem (*Glossina spp.*) 6) Ve střevě vektora dochází k transformaci na procyklické stádium a k binárnímu dělení, 7) Procyklická stádia opouští střevo a mění se na epimastigoty, 8) Ve slinných žlázách se mění na metacyklické stádium a cyklus se uzavírá. Převzato a upraveno z Centers for Disease Control and Prevention, (2019).

Parazitický způsob života s sebou nese rizika spojená s imunitní odpovědí daného hostitele. Trypanosomy byly schopné vyvinout mechanismus antigenů na svém povrchu, které pravidelně mění a tím se snaží zmást imunitní reakci (Horn, 2014). Povrch buňky je tvořen glykoproteiny známé jako VSG (variant surface glycoproteins) a mechanismu jejich obměny říkáme antigenní variabilita, pro kterou má *T. brucei* k dispozici kolem 2000 genů (Fenn et al., 2007).

2.2. Energetický metabolismus

Metabolismus *T. brucei* je adaptabilní k extracelulárnímu prostředí, ve kterém se právě nachází určitá životní forma parazita. Nejlépe jsou prozkoumány tyto jevy u dvou forem zkoumaných

in vitro, a to u PS ze střeva mouchy a u krevní formy DF, která navíc proniká do různých tělních tkání, kde se vyskytuje v krvi a intersticiálních prostorech mezi buňkami jako například tukové tkáni, dále se může dostat do kůže a také do mozku (Trindade et al., 2016; Figueiredo et al., 2017; Tanowitz et al., 2017; Caljon et al., 2016). Různá prostředí nabízejí Trypanosomám různé možnosti získu nutrientů a kyslíku. Rozdílné podmínky pro PS a DF stádium zásadně ovlivňují průběh energetického metabolismu.

Metabolismu se účastní v buňce jediná mitochondrie, která má u skupiny *Kinetoplastida* specifickou strukturu zvanou kinetoplast. Skládá se z konkatenované sítě 2 typů cirkulárních mitochondriálních DNA molekul: maxikroužků, jejichž funkce je kódovat mitochondriální geny pro tvorbu proteinů a minikroužků kódujících gRNA potřebnou pro RNA editing, který byl poprvé objeven u *T. brucei* (Povelones, 2014; Benne et al., 1986). V mitochondrii probíhá mnoho dalších buněčných dějů například syntéza kofaktorů, jako jsou Fe/S klastry, dále respirace, tvorba komplexů dýchacího řetězce, biosyntéza mastných kyselin, metabolismus aminokyselin a některé dráhy energetického metabolismu (Verner et al., 2015).

Metabolické přeměny během životního cyklu souvisí s měněními se formami mitochondrie. V procyklické fázi v hmyzu je mitochondrie funkčně plně aktivní, její struktura je tvořena diskoidními krystami, zatímco u stádií v krvi hostitele je mitochondrie funkčně i morfologicky redukována, je tubulární, s menším počtem krist a morfologicky se podobá promitochondrii u anaerobních kvasinek (Vickerman, 1985; Fenn et al., 2007; Verner et al., 2015).

2.2.1. Energetický metabolismus u DF

U DF stádia je hlavním zdrojem energie glykolýza, zřejmě díky prostředí nabízející bohaté zdroje glukózy. V krvi savců je totiž vysoká hladina glukózy (5mM), která je využita jako významný zdroj energie (Figueiredo et al., 2017). Glykolýza probíhá v glykozómech, což jsou specializované organely u třídy *Kinetoplastida* odvozené od peroxizómů (Opperdoes, 1988). Během tohoto děje je naprostá většina glukózy přeměněna na pyruvát (Berriman et al., 2005). První část glykolýzy čítající 7 enzymů, jejichž úkolem je přeměna glukózy na 3-fosfoglycerát, probíhá v glykozómech (Gualdrón-López et al., 2012). Jelikož je membrána nepropustná pro malé metabolity, existují zde přenašeče, které je přenášejí do cytosolu. Tam probíhá druhá část glykolýzy, kdy je 3-fosfoglycerát postupně přeměněn na pyruvát (Visser et al., 1981). Pyruvát je konečným produktem a je tedy exkretován ven z buňky a jen zanedbatelná část (1 %) je přeměněna na sukcinát v mitochondrii, který je využit k oxidaci NADH (Creek et al., 2015). Vznik a spotřeba molekul ATP a NADH, které jsou součástí glykolýzy v glykozómech, je v rovnováze (Van Hellemond et al., 2005a). Žádné další ATP však není získáno oxidativní fosforylací v mitochondrii (Bienen et al., 1993).

V mitochondrii chybí většina cytochromových komplexů (komplex III až IV) a enzymů. Stejně tak i TCA (Krebsův) cyklus a dráhy oxidativní fosforylace jsou redukovány (Acestor et al., 2011). Jsou zde sice přítomné komplexy I a II, ale jejich funkce není ještě jasně objasněna (Mazet et al., 2013). Přesto má redukovaná mitochondrie podíl na funkčnosti energetického metabolismu. V jejích membránách dochází k procesu, kdy jsou elektrony z oxidovaných substrátů přesunuty na kyslík, tedy k respiraci (Verner et al., 2015). Tento děj probíhá u Trypanosomy specifickou cestou, a to díky již zmíněné TAO (Chaudhuri et al., 1998; Chaudhuri et al., 2006). DF totiž nepoužívají cytochromovou oxidázu v dýchacím řetězci, ale TAO, která je u DF exprimována 100krát více než u PS (Chaudhuri et al., 2006).

H^+ je do mitochondrie transportováno obdobně jako u savců glycerol-3-fosfát/dihydroxyacetonovým komplexem. Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza zde figuruje jako donor elektronů a předává je na ubiquinon, který se následně stává donorem pro TAO. Nevzniká však žádné ATP, protože zde nedochází k translokaci H^+ iontů (Van Hellemond et al., 2005a).

Dalším funkčním enzymem v mitochondrii je F_1/F_0 ATP-syntáza, která ale používá ATP na tvorbu protonového gradientu na membráně mitochondrie a mění ho na ADP a fosfát, funguje tedy v obráceném směru než je obvyklé (Bienen et al., 1981; Nolan et al., 1992). F_1/F_0 ATP-syntáza se ukázala být esenciální pro obě zkoumaná stádia, ale u PS dává vznik ATP (Zíková et al., 2009; Verner et al., 2015).

Takto redukovaný energetický metabolismus je příkladem metabolického přizpůsobení DF na prostředí v savčím hostiteli.

2.2.2. Energetický metabolismus u PS

Oproti DF u PS má v energetickém metabolismu mitochondrie zásadnější roli. Glykolýza je pro toto stádium postradatelná a glykozómy jsou esenciální zřejmě jen pro kompartmentalizaci funkční glykolytické dráhy (Michels et al., 2006). Mitochondrie má oproti DF aktivní dýchací řetězec a oxidativní fosforylaci, navíc zde fungují dvě terminální oxidázy: cytochromová oxidáza (COX) a alternativní oxidáza (TAO) (Chaudhuri et al., 2006). Geny pro všech 8 enzymů Krebsova cyklu jsou u PS přítomny, ale přesto Krebsův cyklus neprobíhá jako spojitý cyklus (Van Hellemond et al., 2005b). Část Krebsova cyklu je využita v metabolismu mastných kyselin, glukoneogenezi a také pro degradaci prolinu. Hlavním zdrojem pro energetický metabolismus Trypanosomy jsou aminokyseliny, z nichž je nejvíce zastoupen právě prolin (Van Hellemond et al., 2005a; Cross et al., 1975; Tielens et al., 1998). Tato aminokyselina totiž slouží jako energetický zdroj krebsajících Glossin, které neskladují glukózu pro výrobu ATP (Bursell et al., 1981).

Prolin je metabolizován v mitochondrii, kde vzniká 2-oxoglutarát, který vstupuje do Krebsova cyklu, což odlišuje *T. brucei* od ostatních eukaryot, u kterých vstupuje do TCA Acetyl-CoA (Bringaud et al., 2006; Verner et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že se PS nachází v anaerobním prostředí ve střevě mouchy, využívá tak zvanou anaerobní fermentaci, tedy metabolismus, kdy je zdroj (prolin či glukóza) metabolizován na fermentační konečné produkty (Cazzulo et al., 1992). PS má více konečných produktů a to například sukcinát, acetát, laktát a alanin (Tielens et al., 1998). Během přeměny na alanin vznikají redukované kofaktory, které se oxidují v dýchacím řetězci a následně je oxidativní fosforylací vyrobeno ATP (Figueiredo et al., 2017).

ATP u PS vzniká třemi cestami. První je již zmíněná oxidativní fosforylace, druhá je fosforylace katalyzována succinyl-koenzym A syntetázou, kdy vzniká ATP místo očekávaného GTP, které vzniká například u savců (Schneider et al., 2007). A třetí možnost je, takzvaným ASCT cyklem, kdy je acetyl koenzym A přeměněn na acetát díky acetát:succinát koenzym A transferáze a fosforylací je uvolněno ATP, za anaerobních podmínek (Van Hellemond et al., 1998).

U PS stádia je dýchací řetězec složen z pěti komplexů (Acestor et al., 2011). Komplexy I-IV mají stejnou funkci jako u vyšších eukaryot, avšak liší se svou stavbou. Oxidativní fosforylace je u Trypanosom částečně odlišná, od té obecné eukaryotické, protože se zde objevují 3 speciální enzymy, které přenášejí elektrony z či na ubiquinon (Verner et al., 2015). Prvním je glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, která dehydrogenuje glycerol-3-fosfát. Druhým je alternativní NADH dehydrogenáza, která z glycerolu-3-fosfátu a NADH přenáší elektrony na ubiquinon a vzniká dihydroxyaceton fosfát (Guerra et al., 2006; Verner et al., 2015). Existence tohoto enzymu ztěžovala výzkum komplexu I u Trypanosom, ale nakonec byla aktivita komplexu I přece jen potvrzena (Verner et al., 2014). Třetím je TAO, která reoxiduje ubiquinol a přenáší elektrony na kyslík (Verner et al., 2015).

Komplex I (NADH:ubiquinon reduktáza) je redukován NADH:ubiquinon oxidoreduktázou či fumarázou (Beattie et al., 1994). Komplex II (sukcinát dehydrogenáza a glycerol-3-fosfát dehydrogenáza) je pro PS esenciální, pokud jsou zdrojem uhlíku aminokyseliny (Coustou et al., 2008). Tyto dva komplexy mají roli donoru elektronů na ubiquinon. Redukcí vzniká ubiquinol, který je reoxidován transportem elektronů a následně přenáší elektrony na TAO, která však netranslokuje protony (Besteiro et al., 2005). Druhou cestou může být přenos ubiquinolu na cytochromové komplexy III a IV, které však už translokují protony a tvoří tak protonový gradient (Acestor et al., 2011). Komplex V, kterým je F_0/F_1 -ATPáza, na rozdíl od DF tvoří z ADP a fosfátu energii v podobě ATP (Verner et al., 2015). Metabolismus parazita je velmi dynamický a prochází změnami tak, aby byl schopen fungovat v různých podmínkách (Figueiredo et al., 2017).

Obrázek 2: Energetický metabolismus *T. brucei*. A) Krevní forma, B) Procyklické stádium. Enzymy: 1) hexokináza, 2) glukóza-6-fosfát izomeráza, 3) fosfofruktokináza, 4) aldoláza, 5) triózafosfát izomeráza, 6) glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, 7) fosfoglycerát kináza, 8) glycerol-3-fosfát oxidáza, 9) glycerol kináza, 10) fosfoglycerát mutáza, 11) enoláza, 12) pyruvát kináza, 13) glycerol-3-fosfát oxidáza, 14) fosfoenol pyruvát karboxykináza, 15) L-malát dehydrogenáza, 16) fumaráza, 17) fumarát reduktáza, 18) pyruvát fosfát dikináza, 19) pyruvát dehydrogenázový komplex, 20) acetát:sukcinát CoA transferáza, 21) prolin oxidáza, 22) Δ -pyrolin-5-karboxylát reduktáza, 23) glutamát semialdehyd dehydrogenáza, 24) glutamát dehydrogenáza, 25) α -ketoglutarát dehydrogenáza, 26) sukcinyl CoA syntetáza, 27) FAD-glycerol-3-fosfát dehydrogenáza. Zkratky: AA, aminokyselina; AcCoA, acetyl-CoA; 1,3-BPGA, 1,3-bisfosfoglycerát; c, cytochrom c; Citr, citrát; DHAP, dihydroxyacetone fosfát; Fum, fumarát; G-3-P, glyceraldehyd 3-fosfát; Glu, glutamát; Gly-3-P, glycerol 3-fosfát; KG, α -ketoglutarát; Mal, malát; OA, 2-oxokyselina; Oxac, oxaloacetát; PEP, fosfoenolpyruvát; 3-PGA, 3-fosfoglycerát; Succ, sukcinát; Succ-CoA, sukcinyl-CoA; UQ, ubiquinone. V barevných rámečcích jsou ohraničeny substráty a exkretované konečné produkty. Převzato a upraveno z Hannaert et al., (2007)

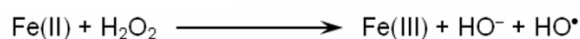
3. METABOLISMUS ŽELEZA

Vzhledem k odlišnostem v energetickém metabolismu u dvou zkoumaných forem, pozorujeme, že i metabolismus železa se liší mezi PS a DF. Zároveň je železo důležitým faktorem ve vztahu mezi patogenem a jeho hostitelem, kdy je parazit závislý na hostitelově zásobě železa (Doherty, 2007).

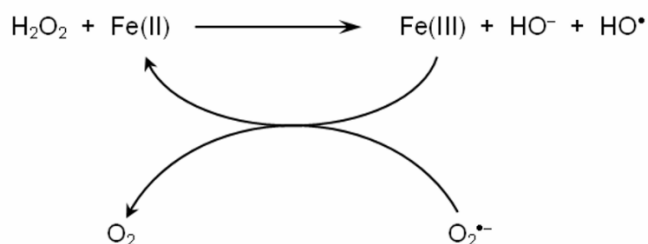
3.1. Železo a jeho obecný význam

Železo je esenciální prvek potřebný pro mnoho buněčných procesů ve všech živých organismech (Kaplan et al., 2009). Obecně je potřebné pro samotnou syntézu nukleových kyselin (DNA a RNA) až po proteiny. Dále hraje roli v proliferaci, respiraci a energetickém metabolismu. V rámci těchto dějů se železo objevuje v redukované či oxidované formě (ionty Fe^{2+} a Fe^{3+}), jedná se tedy o redoxní katalyzátor (Winterbourn, 1995). Je důležitým kofaktorem enzymů, například ribonukleotid reduktázy redukující ribonukleotidy na deoxyribonukleotidy při syntéze DNA (Hofer et al., 1997). Deriváty železa a železo samotné jsou potřebné pro fungování enzymů a podjednotek (cytochrom P450) dýchacího řetězce v mitochondrii, alternativní terminální oxidázy a lipoxygenázy. V abnormálních koncentracích může být pro buňku toxické, degenerativní a podílí se i na buněčné smrti. Železo se účastní formace, avšak i detoxifikace kyslíkových radikálů, jako je například superoxid, peroxid a další volné radikály (Kell, 2009; Dixon et al., 2014). Hydroxylové radikály vznikají takzvanou Fentonovou či Haber-Weissovou reakcí:

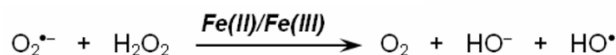
Fentonova reakce



Haber-Weissova reakce (Fentonova reakce katalyzována superoxidem)



Haber-Weissova řetězová reakce



Obrázek 2: Základní mechanismus vzniku volných radikálů u Fentonovy a Haber-Weissovy rovnice. Upraveno a převzato z Barbusiński, (2009).

Všechny organismy, které využívají železo musí mít kontrolu nad jeho transportem, metabolismem a skladováním (Taylor et al., 2010).

Trypanosoma je závislá na železe, které získává ze svého hostitele. Tento klíčový prvek má

důležitou roli ve vztahu mezi ní a jejím hostitelem (Doherty, 2007). Poznatky, které se železa týkají, jsou zkoumány za cílem zdokonalení současné léčby nemocí způsobených parazitickou skupinou *Trypanosomatid* (Basu et al., 2016).

3.2. Železo a savčí hostitel

Při napadení savčího organismu patogenem dochází v těle hostitele k přerozdělení zásob železa. Jedná se o snahu zabránění infekce a také dochází k imunitním mechanismům, jejichž cílem je znemožnění přístupu železa pro parazity (Stijlemans et al., 2015; Del Castillo-Rueda A. et al., 2010).

Savec využívá železo pro syntézu Fe/S klastrů, myoglobinu a hemoglobinu. Nejvíce železa je vázáno právě ve formě hemoglobinu v erythrocytech (Manta et al., 2012). V krvi jsou senescentní erythrocyty fagocytovány specifickými retikuloendoteliálními makrofágy (Kupfferovy buňky) a skrze ně dochází k recyklaci hemového železa (Anderson et al., 2009). V cytoplasmě makrofágu je protein ferroportin, který přenáší Fe^{2+} ionty ven z buňky do krevní plazmy, kde je oxidováno ceruloplasminem na Fe^{3+} a váže se na transferriny (Taylor et al., 2010). Transferriny (Tf) jsou glykoproteiny zajišťující transport Fe^{3+} iontů v krevním séru (Schell et al., 1991). Savec také získává železo z potravy ve formě Fe^{3+} , které je díky enzymu v membráně enterocytů (buňky epitelu *duodena*) redukováno na Fe^{2+} (Taylor et al., 2010). Z cytosolu enterocytů je transportováno železo skrz ferroportin do krevní plazmy a reoxidováno na Fe^{3+} . Ionty Fe^{3+} jsou opět vázány na transferin (Taylor et al., 2010). Transferin je přijímán buňkami díky transferinovému receptoru (Tfr). Receptor s navázaným transferinem putuje do endozomálního systému, kde dochází k odpojení transferinu a iontů Fe^{3+} od komplexu díky kyselému prostředí (Taylor et al., 2010). Transferinový receptor je recyklován zpět na membránu (Taylor et al., 2010). Fe^{3+} je z endozomálního kompartmentu dopravováno skupinou (metalo)transportérů (Kurz et al., 2011). A dále se železo stává součástí takzvaného LIP (labile iron pool), kdy je volně vázáno na nízkomolekulární neproteinové látky v cytosolu a je dostupné pro buňku, ale proces vzniku tohoto uskupení není úplně objasněn (Manta et al. 2012; Kakhlon et al., 2002). Homeostáza v buňce je regulována proteiny IRP (iron regulatory protein) (Taylor et al., 2010).

Železo může být kromě transferinu vázáno na glykoprotein laktoferin, který je sekretován žlázami s vnější sekrecí či buňkami neutrofilů a podílí se na imunitní reakci savců (Rosa et al., 2017).

Cytoplazmické Fe^{3+} ionty jsou při vyšší koncentraci železa skladovány ve formě volného ferritinu (hepatocyty) či ve formě hemosiderinu. Hemosiderin je komplex tvořený lipidy, proteiny, cukry a slouží jako zásobní železo, avšak uvolnění železa z tohoto uskupení je obtížnější než u ferritinu (Iancu et al., 1992). Bývá exprimován v CNS, játrech, reprodukčních orgánech a ve slezině

(Macedo et al., 2008). Homeostáza železa je u savců důsledně kontrolována.

3.3. Příjem železa u Trypanosomy

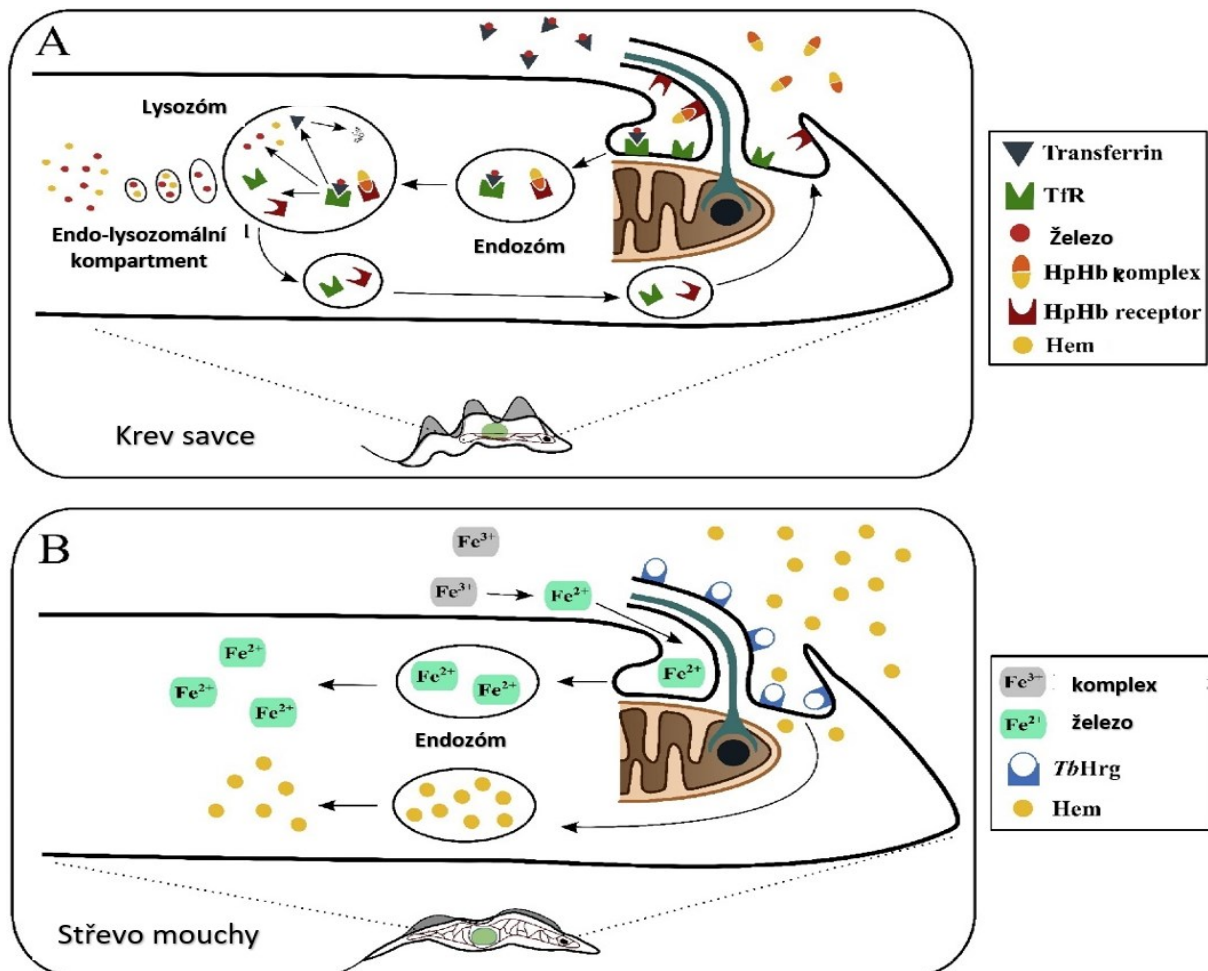
DF si vyvinula sofistikovaný mechanismus pro získávání železa od svého savčího hostitele. Klíčem k příjmu železa je právě savčí transferrin, ale vázán může být i laktoferrin, který patří do rodiny transferrinů a *T. brucei* má pro něj specifický receptor (Tanaka et al., 2004). Častěji přijímaný je však transferrin, který je endocytován v oblasti periflagelární kapsy, jediné části povrchu buňky, která je schopna endocytózy. Specifický transferrinový receptor (TfR) je navázán na membránu v periflagelární kapse pomocí GPI kotvy, která je exprimována genem ESAG6. Dalším genem je ESAG7, který tvoří s ESAG6 komplex. Zároveň jsou geny tvořící heterodimerový komplex (ESAG6/7) vázající transferrin transkribovány společně s geny pro VSG (Ligtenberg et al., 1994; Steverding et al., 1994).

Železo je uvolněno z transferinového komplexu acidifikací v lysozómech Trypanosomy a protein TfR se vrací zpět do její periflagelární kapsy (Steverding et al., 2000; Taylor et al., 2010). Pro cestu z lysozomálního kompartmentu je nutná redukce železa na iont Fe^{2+} . Avšak přesný mechanismus průchodu železa do cytoplazmy není zatím popsán. Roli v tomto procesu zřejmě hraje mucolipin TbMLP, který by mohl zastávat funkci jakéhosi kanálu pro přenos železa z lysozómu do cytosolu (Taylor et al., 2013). V cytosolu se železo nemůže vyskytovat volně kvůli své schopnosti tvořit volné kyslíkové radikály, proto je směřováno do takzvaného chelatačního LIP (labile iron pool), který u eukaryot slouží jako rozcestí v dopravě železa. Umožňuje jeho inkorporaci do metaloproteinů, poskytuje železo na syntézu Fe/S klastrů či jeho export a skladování (Dlouhy et al., 2013). Je tvořen různými ligandy a chemickými sloučeninami, ale přesně složení a podrobnější popis funkce u *T. brucei* nebyl zatím objasněn (Kakhlon et al., 2002).

Trypanosomy také přijímají od svého hostitele porfyrin obsahující železo, tedy hem, protože ho nejsou schopny syntetizovat *de novo* (Basu et al., 2016). Pro DF je zdrojem hemu haptoglobin-hemoglobinový komplex, který je endocytován díky haptoglobin-hemoglobinovému receptoru (Vanhollebeke et al., 2008).

Proces získávání železa u PS není úplně objasněn, přestože získávají větší množství železa kvůli plně aktivní mitochondrii s Fe/S enzymy (Durieux et al., 1991). Ví se, že tato stádia neváží transferrin, který se zřejmě ve střevě Glossiny nevyskytuje (Ligtenberg et al., 1994). Dále bylo zjištěno, že příjem železa prochází mechanismem skládající se ze dvou kroků. Nejdříve jsou redukovány Fe^{3+} ionty na Fe^{2+} ionty, v druhé fázi jsou tyto redukované ionty transportovány, ale přesnější mechanismus není popsán (Mach et al., 2013). Železo ve formě hemu je importováno díky membránovému transportéru TbHrg (heme responsive gene), který je transportérem

nevázaného (volného) hemu (Vanhollebeke et al., 2008). Přijatý hem je inkorporován do hemoproteinů, příkladem mohou být nejvíce zastoupené cytochromy (Basu, et al., 2016).



Obrázek 3: Příjem železa a hemu u *T. brucei*: A) Krevní forma: Savčí transferrin tvoří komplex s transferrinovým receptorem (TfR) v periflagelární kapse, komplex je dále endocytován. V lysozómu je železo uvolněno z komplexu a transportováno skrz endolysozomální komplex do cytosolu. TfR je recyklován do periflagelární kapsy. Hem je ve formě hacto-hemoglobinového komplexu (HpHb) vázán hacto-hemoglobinovým receptorem a endocytován, B) Hmyzí forma: Železo (Fe³⁺) je redukováno na Fe²⁺ a poté endocytováno skrz periflagelární kapsu. Hem je přijímán díky TbHrg (hem responsive gene) proteinu. Převzato a upraveno z Basu et al., (2016).

3.4. Transport a homeostáza železa v buňce

Jednou z důležitých vlastností železa je tvorba enzymových kofaktorů, které klasifikujeme do tří skupin: Fe/S klastry, hem a di/mono-nukleární železo (Waldron et al., 2009). V syntéze Fe/S klastrů je zapojena mitochondrie, která se účastní vzniku jejich mitochondriálních, cytosolických i jaderných verzí (Verner et al., 2015). Pro tvorbu Fe/S klastrů je potřebné železo, jehož průchod ve formě Fe²⁺ skrz vnější mitochondriální membránu zajišťují proteiny MCP

(methyl chemotaxický protein). U *T. brucei* bylo z této skupiny detekováno 24 transportních proteinů podobající se těm u ostatních eukaryot (Colasante et al., 2009). Tyto transportéry mají za úkol kontrolu průchodu proteinů a metabolických látek skrz mitochondriální membránu a udržují redoxní a energetickou ATP homeostázu v buňce (Palmieri et al., 2008). Na průchodu železa se přesněji podílí protein TbMCP17. Gen TbMCP17 kóduje mitochondriální ADP/ATP transportér SLC25A a je jediným homologem mitochondriálních transportéru železa u Trypanosomy (Ruprecht et al., 2019; Zheng et al., 2019). Funkce proteinu TbMCP17 byla potvrzena velmi nedávno výzkumem, kdy jeho odstranění u PS vedlo k ovlivnění růstu buňky, snížení mitochondriálního obsahu železa a životaschopnosti (Zheng et al., 2019). Přestože distribuce železa u Trypanosom se zdá být podobná jako u kvasinek, využívaných jako modelový organismus, na rozdíl od nich se téměř nic neví o skladování železa. Dle teorie by železo mohlo být skladováno v nepříliš prozkoumaném prostředí a uvolňováno v závislosti na kritické hodnotě obsahu železa v cytosolu (Stijlemans et al., 2008). Pokud je v prostředí železa nedostatek či je jeho transport do cytoplazmy blokován, je zřejmě získáváno právě z oné zásobárny (Steverding et al., 1997). Protein TbMCP17 by mohl teoreticky železo přinášet do mitochondrie přednostně v této situaci, ale tato teorie stále čeká na potvrzení (Zheng et al., 2019). O principech, jakým je železo skladováno či exportováno ven z buňky se také příliš mnoho neví. Organely zvané acidokalcizómy jsou adeptem na roli ve skladování železa, neboť u nich byla nalezena obdoba vakuolárního železo transportujícího proteinu (VIT1) (Huang et al., 2014). Dalším proteinem, který se účastní redistribuce železa a zřejmě udržuje jeho homeostázu v buňce je trypanozomální homolog takzvaného LIR1 (leishmania iron regulator). Jak funguje u *T. brucei* není zatím popsáno, avšak u Leishmanií exportuje železo ven z buňky do extracelulárního prostoru (Laranjeira-Silva et al., 2018).

3.4.1 Fe/S klastry

Železo-sírné klastry jsou kofaktory enzymů, které jsou esenciální pro život u všech živočišných domén (Lill et al., 1999). Zapojují se do životně důležitých procesů jako je energetický metabolismus, replikace a reparace DNA, regulace genové exprese, ale také fotosyntéza. S tím souvisí i jejich přítomnost v různých buněčných kompartmentech, jako je mitochondrie, endoplazmatické retikulum, cytosol a jádro (Lill et al., 2012; Tsaousis, 2019). Jsou kofaktory proteinů elektron-transportního dýchacího a fotosyntetického řetězce a dále také tvoří redoxní centrum mobilních elektronových transportérů, ferredoxinů (Johnson et al., 2005).

U klastrů účastnících se elektronového transportu existují čtyři různé formy, a to [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] a [8Fe-7S], které se vyskytují v různých oxidačních stavech a konformacích

(Johnson et al., 2005).

Bylo dokázáno, že mitochondriální biosyntetická dráha Fe/S klastrů je esenciální pro existenci eukaryotické buňky (Lill et al., 1999). Tento objev byl potvrzen u kvasinek (Braymer et al., 2017), savčích buněk (Rouault et al., 2017), ale také Trypanosom (Peña-Diaz et al., 2018).

V rámci biosyntézy Fe/S klastrů rozlišujeme 4 dráhy. Mitochondriální – ISC, jejíž zkratka pochází z anglického iron-sulfur cluster, cytosolickou - CIA (cytosolic iron assembly) (Peña-Diaz et al., 2018; Lill et al., 2015). Další dráha NIF (nitrogen fixation) byla objevena u N₂ fixujících bakterií, SUF (sulfur fixation) se nachází u bakterií a v plastidech eukaryot, dále sem však můžeme zařadit i dráhu CSD (cystein-sulfinát desulfinát), která je z části funkčně homologní k SUF (Takahashi et al., 2002; Loiseau et al., 2005).

U Trypanosomy probíhají dráhy ISC a CIA, jejichž všechny potřebné komponenty jsou exprimovány v mitochondrii a cytosolu (Basu et al., 2016). Z článku Peña-Diaz et al., (2018) lze vyvodit i skutečnost, že se u Trypanosom vyskytuje i protein CsdA, který je součástí CSD dráhy, tento jev však nebyl více popsán a pro tuto práci není zásadní.

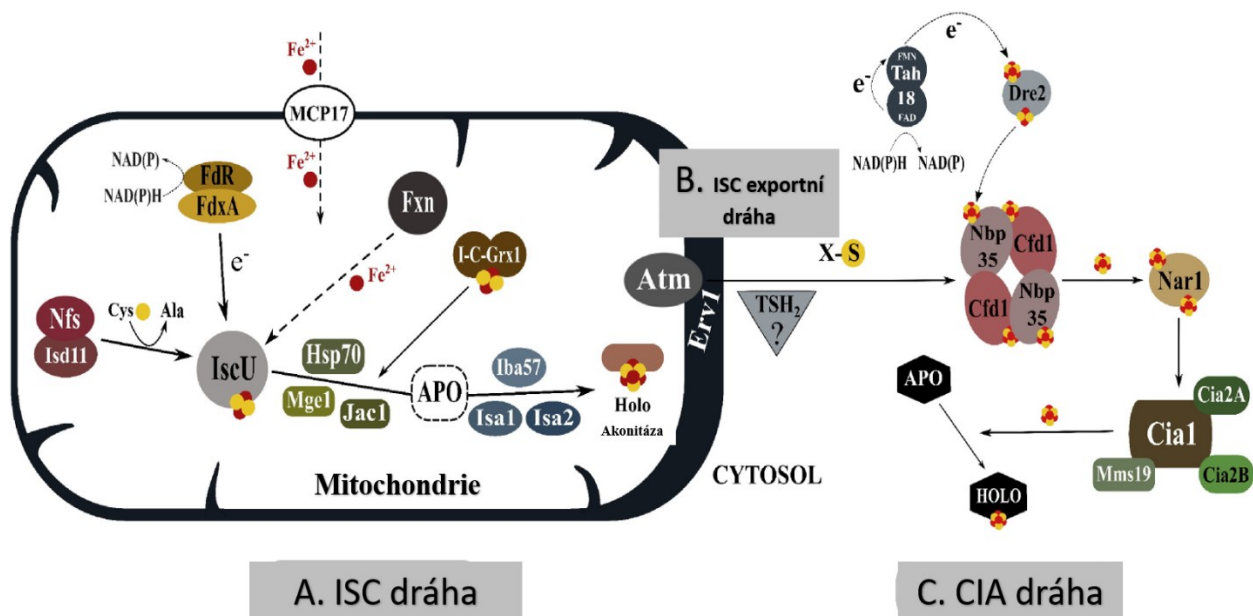
Tab 1.

Komponenty ISC, CIA a CSD přítomné u <i>T. brucei</i>	
ISC	Nfs, IscU, Isd11, Isa1, Isa2, Fdx, Fnx, Nfu, Iba57, Atm1
CIA	Cfd1, Nbp35, Dre2, Tah18, Nar1, Cia1, Cia2, Mms19
CSD	CsdA

Upraveno a převzato z Peña-Diaz et al., (2018)

3.4.1.1. Mitochondriální dráha – ISC

Samotnou dráhu ISC můžeme obecně rozdělit na 4 části (Braymer et al., 2017). Za prvé je potřeba nasyntetizovat [2Fe-2S] klastry, které se syntetizují *de novo*. Za druhé jsou klastry přesunuty a vloženy do transportních proteinů v mitochondrii. Nicméně dále jsou klastry [2Fe-2S] v mitochondrii inzerovány do cílových proteinů, které mohou být dále využity na syntézu klastrů [4Fe-4S] či transportovány ven z mitochondrie. A na závěr jsou syntetizované [4Fe-4S] klastry přesunuty do cílových apoproteinů (Braymer et al., 2017).



Obrázek 4: Biosyntéza Fe/S clusterů u *T. brucei*. A) ISC dráha: Transportní protein MCP17 (methyl chemotaxický protein) přináší Fe^{2+} ionty, Nfs-Isd11 (komplex cystein desulfurázy) je donor síry, scaffold protein IscU (iron-sulfur cluster) je platforma pro děje, Fdx (ferredoxin) a Fdr (ferredoxin reduktáza) přinášejí elektrony z dýchacího řetězce, Fxn (frataxin) se teoreticky účastní biosyntézy, ale funkce není objasněna, komplex chaperonových proteinů Hsp70, Mge1, Jac1 inkorporují clustery do apoproteinů, 1-C-Grx1 (glutaredoxin) koordinuje [2Fe-2S] cluster, komplex Iba57, Isa1, Isa2 se podílejí na vzniku akonitázy (holoproteinu) B) ISC exportní dráha: Začíná ABC transportérem Atm1 a sulfhydryl oxidázou Erv1 ve vnitřní mitochondriální membráně, TSH₂ (dithiol trypanothion) jehož funkce není popsána, X-S jsou neznámé elementy obsahující síru a jsou transportovány ven z mitochondrie. C) CIA dráha: [4Fe-4S] cluster je syntetizován na Cfd1/Nbp35 scaffold proteinovému komplexu za účasti elektronů dopravených díky Tah18/Dre2, [4Fe-4S] je zapojen do apoproteinů přes protein Nar1 a komplex Cia1, Cia2A, Cia2B a Mms19. Převzato a upraveno: Basu et al., (2016).

U *T. brucei* bylo potvrzeno, že syntéza [2Fe-2S] klastrů probíhá na scaffold proteinu IscU (či Isu1, což je jeho obdoba u kvasinek). IscU zde funguje jako platforma pro děje spojené se syntézou Fe/S klastrů (Basu et al., 2015). Donorem síry pro tvorbu klastrů je komplex cystein desulfurázy Nfs-Isd11 (Zheng et al., 1994). Síra je získána z cysteinu, který je cystein desulfurázou přeměněn na alanin (Li et al., 2001; Zheng et al., 1994) Protein Nfs1 je redukován elektrony z transportního řetězce, které jsou přenášeny Fdx(A) za účasti FdR a NADH (Lange et al., 2000). Díky tomuto procesu vzniká sulfid, který může být použit pro tvorbu Fe/S klastrů. IscU a Nfs se podílejí na syntéze klastrů jak v mitochondrii, tak v cytosolu (Smíd et al., 2006). Nezbytným partnerem pro Nfs v procesu biosyntézy mitochondriálních i cytosolických klastrů se ukázal být protein Isd11 (Paris et al., 2010). Proteiny Isd11 a Nfs se zapojují i do thiolace tRNA, dochází tedy

skrz síru k propojení syntézy Fe/S klastrů a modifikací v tRNA (Paris et al., 2010; Alfonzo et al., 2011). Vzniklý komplex Nfs-Isd11 se váže na protein IscU, avšak bližší princip vázání a vznik klastru nebyl zatím popsán (Basu et al., 2016).

Dalším potřebným prvkem pro Fe/S klastry je samozřejmě železo, o jehož vázání na IscU se také příliš mnoho neví, ale byla potvrzena role multifunkčního proteinu frataxinu (Fnx), který se vyskytuje v mitochondrii u obou zkoumaných stádií trypanosom (Kovářová et al., 2014). Tento protein se obecně účastní mnoha procesů, avšak u trypanosom byla potvrzena jen funkce v degradaci ROS a syntéze Fe/S klastrů (Long et al., 2008).

Po syntéze [2Fe-2S] klastrů následuje jejich uvolnění ze scaffold proteinu IscU, které dále prochází drahou transferových proteinů. Jedná se o chaperonový komplex proteinů Hsp70 (heat shock protein) společně s SSq ATPázou, co-chaperonem Jac1 a Mge1 (Lill et al., 2009).

Poté se může Fe/S uvolnit a rovnou se stát součástí apoproteinu, ale další možností je, že může být převezen do apoproteinu pomocí monothiol glutaredoxinu (Grx), tento princip byl prokázán *in-vitro* (Lill et al., 2012). Grx jsou proteiny zahrnuté v procesech redoxního metabolismu a v biosyntéze Fe/S klastrů (Basu et al., 2015). U Trypanosom jsou kódovány 3 monothiol Grx: 1-C-Grx1, 1-C-Grx2 a 1-C-Grx3 a zřejmě všechny jsou schopny koordinovat Fe/S klastry (Manta et al., 2013b). 1-C-Grx je protein hojně se vyskytující v mitochondrii, který je schopen transportovat [2Fe-2S] klastry, díky navázání na aktivní místo Cys104 N-konce (Manta et al., 2013b). Jeho kofaktorem je glutathion a jako ligand může být použit glutathionyl-spermidin či trypanothion [T(SH)₂] (Manta et al., 2013a). Trypanothion je protein specifický pro třídu *Kinetoplastida* a je schopen tvořit volné stabilní proteinové Fe/S klastrové struktury, které se *in-vitro* inkorporují do cytosolického dithiolu 2-C-Grx1 (Manta et al., 2013a).

Syntéza [4Fe-4S] z [2Fe-2S] klastrů probíhá díky scaffold proteinům Isa1 a Isa2 (IscA), ty jsou pro PS důležité, protože dopravují Fe/S klastry pro tvorbu proteinů (př. fumaráza, akonitáza, sukcinát dehydrogenáza) a dále se také podílí protein Iba57 (Basu et al., 2014). DF proto zřejmě postrádá proteiny Isa, neboť se v jeho redukované mitochondrii netvoří výše zmíněné proteiny. Navíc u DF se protein Iba57 ukázal být postradatelný, ale u PS je esenciální (Basu et al., 2014). Důvodem může být to, že zapojením Isa1, Isa2 a právě proteinu Iba57 vzniká akonitáza jako holoprotein, který se účastní Krebsova cyklu u PS (Basu et al., 2016; Saas et al., 2000).

Poslední částí mitochondriální syntézy klastrů je jejich zabudování do apoproteinů, které je zprostředkováváno cílovými faktory Nfu1, Ind1 a BolA (Lill et al., 2012; Peña-Díaz et al., 2018). U Trypanosom jsou exprimovány 3 paralogy proteinu Nfu, které se nachází v mitochondrii a cytosolu a jsou esenciální (Benz et al., 2016). Nfu1 se podílí na syntéze mnoha proteinů, dobré je zmínit například komplexy dýchacího řetězce I a II a syntázu kyseliny lipové. Ind1 se podílí

také na syntéze komplexu I (Lill et al., 2012). Avšak funkce proteinu BOLA ještě nebyla objevena, ví se jen, že je homologem proteinu, který v obecném popisu ISC dráhy interaguje s Grx (Peña-Díaz et al., 2018).

3.4.1.2. Exportní dráha – ISC

Mezi mitochondrií a cytosolem se nachází proteinový systém spojující dráhy ISC a CIA. Tento systém označujeme jako ISC exportní dráhu. Pro syntézu cytosolických a mitochondriálních klastrů je potřeba transportovat ven z mitochondrie glutathion- a síru- obsahující komponenty (X-S), které jsou v cytosolu dále využívány (Srinivasan et al., 2014).

Transport probíhá přes mitochondriální membrány. Průchod přes vnitřní membránu je zprostředkován ABC transportérem Atm1, dále mezimembránovou sulfidyl oxidázou Erv1 a samotným glutathionem (Kispal et al., 1999; Sipos et al., 2002). Protein Erv1 u Trypanosom neinteraguje s Mia40, což je protein, který se vyskytuje u vyšších Eukaryot a který u Trypanosom zřejmě chybí (Basu et al., 2013; Allen et al., 2008). Bylo dokázáno, že Erv1 nespolupracuje na mitochondriálním importu a exportu s dalšími proteiny a funguje zde sám (Haindrich et al., 2017). Při ablaci proteinu Erv1 dochází u PS ke snížení mitochondriálního potenciálu a redukci mitochondrie. Erv1 je totiž multifunkční protein, který je schopen využívat kyslík a cytochrom c jako elektronový akceptor *in vitro* a společně s cytochromem c se nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrie (Haindrich et al., 2017; Basu et al., 2013). Zároveň ale dochází k defektům ISC i CIA drah (Haindrich et al., 2017). Erv1 je totiž přidružen k proteinu Atm1, který je součástí ISC, ale navíc i pro CIA se ukázal býti esenciální (Lange et al., 2001; Lill et al., 2015).

3.4.1.3. Cytosolická dráha – CIA

Cytosolická dráha CIA je přítomná u všech eukaryot, ale nemusí obsahovat všechny známé proteiny (Tsaousis et al., 2014). U Trypanosom byly však detekovány všechny prozatím známé proteiny (*viz Tabl.*). CIA navazuje na mitochondriální ISC a ISC exportní dráhu, na kterých závisí i její funkčnost. Z ISC jsou totiž exportovány glutathionové a síru obsahující komponenty (X-S), které jsou dále využívány v dráze CIA, nejsou však blíže popsány (Srinivasan et al., 2014). Díky CIA dráze se syntetizují cytosolické a jaderné Fe/S klastry, které jsou důležité pro syntézu a opravné mechanismy DNA, jsou esenciálními komponenty translačního systému (Lukeš et al., 2015).

U Trypanosom bylo prokázáno, že ablace jednoho proteinu CIA dráhy nemá téměř žádný vliv na životnost buňky, výjimkou jsou jen proteiny Nbp35 a Cfd1 (Basu et al., 2014). CIA dráhu můžeme rozdělit na dvě části, právě paralelní ablace dvou proteinů z rané a střední části dráhy zastaví růst buňky. Závěr tohoto experimentu je, že jen silná ablace CIA proteinů má nějaké další fenotypové

projevy (Basu et al., 2014).

V první části CIA dráhy je [4Fe-4S] klastr syntetizován na scaffold proteinech Cfd1 a Nbp35, což jsou NTPázy tvořící heterotetramerickou P-smyčku (Lukeš et al., 2015). Pro produkci Fe/S klastru a funkci Nbp35, je zapotřebí zapojení dalších proteinů a to flavoproteinů (diflavin reduktázy) Tah18 a Dre2 (Netz et al., 2010). Tah18 přináší elektrony z NADH v elektronovém dýchacím řetězci na Dre2, na kterém je vázán Fe/S klastr (Netz et al., 2010).

Následuje střední část a uvolnění [4Fe-4S] klastru z komplexu Cfd1-Nbp35, za účasti proteinů Nar1 a cílového komplexu Cia1-Cia2A-Cia2B-Mms19 (Lukeš et al., 2015). Cílový komplex má dvě funkce, přenést a inzerovat klastry do cytosolických či jaderných apoproteinů. Cia1 a Cia2B nasedají na C-koncovou doménu proteinu Mms19 a tak tvoří komplex (Tonini et al., 2018). Byly nalezeny dva geny kódující Cia2 (A,B) proteiny v *T. brucei*, které byly dříve objeveny i u člověka a kvasinek (Tonini et al., 2018; Tsaousis et al., 2014). Cia2A je u člověka (savců) součástí syntézy proteinu IRP1 podílejícího se na regulaci železa a buněčné homeostáze (Stehling et al., 2013). IRP1 neboli akonitáza se vyskytuje i u Trypanosom (TbACO), ale její funkce je stále zkoumána (Saas et al., 2000).

3.4.2. Proteiny obsahující Fe/S klastry

3.4.2.1. Akonitáza (Izo-citrát hydrolyáza)

Akonitáza je enzym který se účastní Krebsova cyklu, kde katalyzuje dehydrataci citrátu na izocitrát, kdy jako mezičlánek vzniká *cis*-akonitát (Manta et al., 2012). Akonitáza má katalytické centrum, které obsahuje [4Fe-4S] klastr. Toto centrum je citlivé na kyslík a oxiduje se na [3Fe-4S] formu, která je neaktivní (Manta et al., 2012). U savčích buněk byly popsány 2 typy akonitáz, a to akonitáza mitochondriální a cytosolická. Mitochondriální akonitázy se účastní Krebsova cyklu, zatímco cytosolická (IRP1) se mimo jiné podílí na homeostáze a regulaci železa (Saas et al., 2000).

U Trypanosom se nachází jen jedna TbACO, která byla lokalizována, jak v mitochondrii, tak v cytosolu (Saas et al., 2000). Při knock-outu genu ISC dráhy IscS či IscU či Isd11 dochází u PS stádia ke snížení aktivity TbACO v cytosolu i mitochondrii (Paris et al., 2010; Smíd et al., 2006)

3.4.2.2. Fumarát hydratáza (Fumaráza)

Fumarázy jsou proteiny, které způsobují reverzibilní hydrataci fumarátu na malát, účastní se tak fermentačních drah sukcinátu. Vyskytují se u prokaryot i eukaryot a rozlišujeme dvě izoformy: mitochondriální a cytosolická. Mitochondriální fumarázy se účastní Krebsova cyklu a aerobní respirace, zatímco cytosolické se podílí na metabolismu fumarátu v cytosolu. Fumarázy se dají také dělit na dvě skupiny, které si nejsou sekvenčně podobné, ale zastávají stejné funkce. Fumarázy I

jsou homodimerické struktury obsahující Fe/S klastry a jsou termolabilní, druhá skupina Fumarázy II jsou termostabilní homotetramery obsahující železo (Manta et al., 2012)

U Trypanosom, a to jen u PS se vyskytují pouze fumarázy typu I (Coustou et al., 2006).

3.4.2.3. Sukcinát:ubiquinon reduktáza

Sukcinát:ubiquinon reduktáza tvoří komplex II dýchacího řetězce, ale účastní se i Krebsova cyklu. Jeho rolí je transport elektronů na ubiquinon (Verner et al., 2014). Podjednotky tohoto proteinu obsahují Fe/S klastry a hem. Vyskytuje se jen u PS (Acestor et al., 2011)

3.4.2.4. NADH:ubiquinon oxidoreduktáza

Komplex I dýchacího řetězce čili NADH:ubiquinon oxidoreduktáza funguje jako protonová pumpa, jejíž rolí je transport elektronů z redukovaného NADH na ubiquinon (Verner et al., 2014). Ubiquinon regeneruje NAD^+ a přenáší protony z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (Verner et al., 2014). Komplex I se vyskytuje u PS i DF, ale pro krevní formu není esenciální, neboť ta přednostně využívá alternativní NADH dehydrogenázu (Surve et al., 2012). Skládá se z 19 podjednotek a v katalytické části se nachází 7 Fe/S klastrů a kofaktor flavin mononukleotid (Verner et al., 2014).

3.4.2.5. Ubiquinon:cytochrom c oxidoreduktáza

Cytochrom c (oxido)reduktáza tvoří v dýchacím řetězci takzvaný komplex III. Její funkcí je redukce ubiquinolu a tvorba protonového gradientu. Je to cytochromový komplex obsahující hem a Fe/S klastry (Verner et al., 2014). Součástí je například protein Rieskeův (Rieske), který obsahuje Fe/S klastry a ukázal se být esenciální pro dýchání a udržení mitochondriálního protonového gradientu (Paris et al., 2009). Komplex III se vyskytuje u PS, ale u DF chybí (Acestor et al., 2011).

3.4.3. Proteiny s jinak vázaným železem

3.4.3.1. Alternativní oxidáza (TAO)

V elektron-transportním řetězci mohou figurovat dva druhy terminálních oxidáz. Prvním druhem je klasická cytochromová oxidáza, druhým typem je alternativní oxidáza, která je nezávislá na cytochromu (Chaudhuri et al., 2006). Cytochromová oxidáza je složena z více podjednotek a nevyskytuje se u DF, zatímco alternativní oxidáza neboli TAO se vyskytuje u obou stádií a jedná se jen o jeden polypeptid s di-železitým aktivním místem (Chaudhuri et al., 2006; Chaudhuri et al., 1998; Shiba et al., 2013). TAO je součástí energetického metabolismu, jak bylo vysvětleno v kapitole o metabolismu a její funkce se liší u PS a DF, pro obě stádia však zřejmě esenciální (Chaudhuri et al., 2006) Dalšími funkcemi je role v buněčné signalizaci v rámci regulace genové

exprese, redoxní rovnováže a dokonce i v buněčné smrti (Chaudhuri et al., 2006). Pro větší porozumění funkcí tohoto speciálního enzymu je však potřeba dalších zkoumání. Motivací může být výzkum léčiv zaměřený na inhibici TAO (Chaudhuri et al., 2006).

3.4.3.2. Superoxid dismutáza (SOD)

Superoxid dismutázy jsou enzymy, které se podílejí na regulaci oxidačního stresu. Jsou to antioxidanty, které přeměňují nežádoucí superoxidové radikály na kyslík a peroxid vodíku (McCord et al., 1969). Díky této funkci se stávají potenciálním cílem pro vývoj léčiv. Superoxid dismutázy jsou metalloproteiny a dají se rozdělit do tří skupin, podle toho, který kov využívají jako kofaktor. První skupina obsahuje Cu/Zn, druhá Mn a třetí Fe. U většiny eukaryot se však poslední zmíněná forma nevyskytuje (Wilkinson et al., 2006). Trypanosomy však tvoří jednu z výjimek a na druhou stranu obsahují právě jen Fe-SODs (Le Trant et al., 1983; Wilkinson et al., 2006). *T. brucei* tvoří 4 izoformy SODs, dva proteiny jsou glykozomální a dva mitochondriální. Superoxid dismutázy se vyskytují u PS, ale i u DF (Wilkinson et al., 2006)

3.4.3.3. Ribonukleotid reduktáza

Ribonukleotid reduktázy jsou enzymy potřebné pro syntézu DNA, jejich role spočívá v katalýze redukce ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy. Ribonukleotid reduktázy klasifikujeme do tří tříd. První třída je nejvíce zastoupená u eukaryotických organismů a nalezneme je i u Trypanosom (Manta et al., 2012). Jsou to heterotetramerické enzymy tvořeny dvěma podjednotkami R1 a R2 (Manta et al., 2012; Hofer et al., 1997). U eukaryot lze obecně říci, že podjednotka R1 váže specifické substráty a zajišťuje regulaci, zatímco malá podjednotka R2 obsahuje katalytické di-železité centrum, které se podílí na redukci nukleotidů na ribonukleotidy za vzniku disulfidu. Následně je ribonukleotid reduktáza vrácena do aktivního stavu redukcí vzniklého disulfidu díky thioredoxinu. Obě podjednotky R1 i R2 byly potvrzeny i u *T. brucei* (Hofer et al., 1997). U tohoto parazita však existují specifické reduktanty ribonukleotid reduktázy: tryparedoxin (thioredoxinová oxidoreduktáza), dithiol a částečně i glutaredoxiny (Lüdemann et al., 1998; Dormeyer et al., 2001; Ceylan et al., 2010). Aktivita tohoto enzymu je regulována selektivní expresí podjednotky R2 a redukčním mechanismem (Breidbach et al., 2000; Dormeyer et al., 2001). Informace o biochemii ribonukleotid reduktáz jsou však stále nedostatečné, příkladem může být i systém, kterým je železo inkorporováno do proteinu (Manta et al., 2012)

3.4.3.4. Steaoryl-CoA desaturázy

V syntéze mononesaturovaných mastných kyselin, které vznikají ze saturevaných mastných kyselin, působí enzymy steaoryl-CoA desaturázy. Jsou to di-železo obsahující proteiny, které jsou ukotveny v membráně endoplazmatického retikula (Manta et al., 2012). Ukázaly si být

nepostradatelné pro obě zkoumaná stádia (Alloatti et al., 2011).

3.4.3.5. Dinitrosylové komplexy obsahující železo (DNICs)

Krevní stádia Trypanosom jsou v krvi či fagozómech makrofágů vystavovány reaktivním kyslíkovým a dusíkovým radikálům, které vznikají jako imunitní reakce (Ascenzi et al., 2003). Proti této obraně savčího hostitele si Trypanosomy vytvořily mechanismus, kdy dávají vznik železo obsahujícím dinitrosylovým komplexům. Tyto komplexy vznikají interakcí pro Trypanosomy specifickým trypanothionem T(SH₂), NO a Fe²⁺ a zřejmě se podílejí v zachycování NO radikálů a předcházení jejich vzniku (Bocedi et al., 2010).

3.4.4. Hem

Hem čili porfyrin obsahující železo jako centrální kovovou skupinu, je prostetická skupina figurující v mnoha buněčných dějích, díky schopnosti železa přecházet do oxidovaného stavu. U eukaryot je součástí elektron-transportního řetězce, transportu kyslíku, obrany proti oxidačnímu stresu a detoxifikace (Basu et al., 2016). Jsou známy tři druhy hemu, a to hem *a*, hem *b* a hem *c*. Trypanosomy patří mezi výjimky, neboť nejsou schopny hem syntetizovat, ale jsou plně závislé na příjmu z hostitele (Kořený et al., 2013). U *Trypanosoma cruzi* byla detailněji zkoumána dvoukroková přeměna hemu *b* na hem *a*, za účasti FdxA a Fdx a hem-syntáz, tuto schopnost má zřejmě i *T. brucei* (Buchensky et al., 2010). Obě zkoumané formy *T. brucei* se nachází v prostředí, kde se nachází dostatek hemoglobinu, avšak zisk hemu probíhá odlišně, jak bylo již zmíněno v kapitole o příjmu železa. Transport a distribuce hemu do různých kompartmentů je zatím neobjasněna. Přijatý hem je inkorporován do hemoproteinů, které se účastní esenciálních metabolických drah, jako je biosyntéza sterolů, polynasaturovaných mastných kyselin a konečně komponentů dýchacího řetězce (Tripodi et al., 2011).

3.4.4.1. Hemoproteiny

Nejvíce zastoupenými hemoproteiny jsou cytochromy, které obsahují všechny známé druhy hemu (Basu et al., 2016). Cytochrom *b5* má roli elektron-transportního komponentu v desaturaci mastných kyselin v endoplazmatickém retikulu (Manta et al., 2012).

Cytochrom *P450* se podílí na syntéze sterolu, je součástí elektron-transportního řetězce a katalyzuje některé oxidační reakce v buňce (Manta et al., 2012). Cytochromy *c* a *c1* zprostředkovávají elektronový transport během oxidativní fosforylace a nacházejí se v mezimembránovém prostoru mitochondrie (Basu et al., 2016). V mitochondrii Trypanosom zřejmě existuje ojedinělá biogenetická dráha pro cytochrom *c*, ale nebyla zatím přesněji popsána (Allen, 2011).

3.4.5. Detoxifikace ROS

Je nezpochybnitelné, že je železo pro Trypanosomy velmi důležitým prvkem, avšak schopnost tvorby kyslíkových volných radikálů komplikuje jeho využití. Aby se zabránilo hromadění volných radikálů v cytosolu, existují dvě cesty, jak se s volným železem vypořádat. První možností je ho skladovat a za druhé je možno ho exportovat z buňky ven (Laranjeira-Silva et al., 2018). Oba tyto principy nejsou u Trypanosom dostatečně prozkoumány, nicméně nový pohled na tuto problematiku mohou nabídnout data získaná z jejich příbuzných (např. Leishmanií).

3.4.5.1. Acidokalcizómy

Acidokalcizómy jsou organely, které byly poprvé pojmenovány právě u Trypanosom, avšak postupem času se ukázalo, že se vyskytují u všech možných evolučních větví od bakterií až po člověka (Moreno et al., 2009; Docampo et al., 2005) Vnitřní prostředí acidokalcizómů je kyselé a je zprostředkováno protonovými pumpami, aquaporiny, ATPázami a antiportery (Docampo, 2016). Funkcí těchto organel je zřejmě skladování Ca^{2+} iontů, dále obsahují fosfor v různých formách (orthofosfát, polyfosfát), další funkcí je autofágie a osmoregulace (Lander et al., 2016; Maslov et al., 2019). Acidokalcizómy by zřejmě mohly hrát roli jako zásobárny železa, podkladem pro tuto teorii je studie na Trypanozomám příbuzných Leishmaniích (*L. amazonensis*), které v prostředí bohatém na železo akumulovaly tento prvek právě v acidokalcizómech (Miranda et al., 2004a). Acidokalcizómy jsou zjevně účastníky v homeostáze železa a mají schopnost se přizpůsobovat prostředí, ve kterém se parazit právě nachází tím, že mění svůj obsah (Miranda et al., 2004b). Složení acidokalcizómů se u organismů liší a lze tvrdit, že role těchto organel je u každé živočišné evoluční větve speciální, obsah acidokalcizómu u Trypanosom může být tedy zcela odlišný od ostatních eukaryot (Moreno et al., 2009).

Železo (či jiné kovy) je vázáno na polyfosfát a bylo objeveno u více druhů zkoumaných Trypanosomatid. (Docampo et al., 2005; Miranda et al., 2004b).

3.4.5.2 VIT 1

Pro vstup železa do acidokalcizómu je u *T. brucei* využíván ortholog takzvaného VIT1 (vacuole iron transporter), který byl objeven u *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2006; Huang et al., 2014). U rostlin může být VIT 1 cestou k léčbě lidských onemocnění vzniklých v důsledku nedostatku železa, neboť jeho modifikací lze dosáhnout větší akumulace tohoto prvku v plodinách (De Steur et al., 2015). Tento transportér je však navíc ortologem již dříve objeveného kvasinkového CCC1 (Ca^{2+} - sensitive cross complementor) (Li et al., 2001) Gen CCC1 kóduje transportér, který přesouvá železo z cytosolu do vakuoly, kde je kov skladován, podílí se také nejspíš i na skladování Mn (Li et al., 2001). Postupem času byl tento transportér objeven u více organismů a mohl by

například vést k léčbě malárie způsobené parazitem *Plasmodium falciparum* (Weiner et al., 2016). VIT1 je důležitý i pro *T. brucei*, neboť knockdown genu VIT1 měl vliv na proliferaci a růst u obou zkoumaných stádií (Huang et al., 2014).

3.4.5.3. LIR 1

LIR 1 (*Leishmania* iron regulator) je protein, který se nachází na plazmatické membráně Leishmanií a podílí se na jejich virulenci, růstu a homeostáze železa. LIR 1 patří do skupiny takzvaných MFS (major facilitator superfamily) proteinů a existuje podobnost s proteiny, které se podílejí na transmembránovém transportu železa u rostlin (Gollhofer et al., 2011). LIR 1 zabraňuje hromadění železa v buňce a toxicitě tím, že ho exportuje ven (Laranjeira-Silva et al., 2018). Ortolog LIR 1 byl objeven i u *T. brucei*, lze proto spekulovat, zda tento mechanismus využívá i tento parazit (Aslett et al., 2009; Laranjeira-Silva et al., 2018). Studie zabývající se touto problematikou přímo u *T. brucei* však zatím nebyla publikována. LIR 1 může být dalším cílem ve vývoji léčiv, protože má roli ve virulenci Leishmanií tím, že je v hostiteli chrání před akumulací toxického železa v jejich parazitické vakuole (Sarkar et al., 2019).

4. CHEMOTERAPEUTIKA

Vzhledem k vážným vedlejším účinkům a rostoucím rezistencím na zastaralá léčiva je zapotřebí hledat další látky pro výrobu vhodnějších medikamentů. Chemoterapeutika jsou jedinou možností léčby nemoci, neboť vakcína stále neexistuje (Black et al., 2016).

Chelátory čili siderophory jsou látky s velkou afinitou k železu, a díky této vlastnosti se dostaly do oblasti zájmu ve vývoji léčiv. Chelátory mají potenciál se stát součástí medikamentů, problémem je však fakt, že řada z nich působí toxicky i na pacientovy (savčí) buňky (Merschjohann et al., 2006).

Jednou z nadějných látek může být deferoxamin. Deferoxamin je železný chelátor získaný z bakterie *Streptomyces pilosus*, je účinnou látkou léku Desferal®, který se používá například při léčbě akutní otravy železem (Schupp et al., 1987; Merschjohann et al., 2006). Ukázalo se ale, že deferoxamin inhibuje proliferaci krevních forem Trypanosomy, které jsou desetkrát více náchylné na účinky této látky než savčí buňky (Breidbach et al., 2002). Principem deferoxaminu je chelatace vnitrobuněčného železa tak, aby se nemohlo inkorporovat do nově syntetizovaných železo obsahujících apoproteinů. Molekulární mechanismus však zatím není popsán (Breidbach et al., 2002). Deferoxamin má zřejmě vliv na ribonukleotid reduktázu, dochází k inhibici syntézy DNA a také na TAO, což se projevuje sníženou spotřebou kyslíku (Breidbach et al., 2002). Dle Amisigo et al., (2019) způsobuje i defekty na mitochondriální membráně. Tato látka však nebyla schopna zneškodnit všechny parazitické buňky v lidské krvi, nejspíš proto, že se v tomto prostředí rozkládá příliš rychle (Kontoghiorghes, 1995). Další nevýhodou je, že působí toxicky na některé lidské buňky (Breidbach et al., 2002; Merschjohann et al., 2006).

Železné chelátory jsou také ve skupině sekundárních metabolitů rostlin, tedy fenolických kyselin, které působí negativně nejen na protisty, ale i na bakterie a rakovinné buňky (He et al., 2016; Maurya et al., 2010). Největší antitrypanozomální účinky má kyselina gallová, zřejmě díky jejímu chemickému uspořádání a volné hydroxylové skupině, která dává vznik ROS (Maurya et al., 2010). Kyselina gallová je schopna zneškodnit všechny buňky *T. brucei* v krvi (Amisigo et al., 2019). Má vliv na morfologii parazita, kdy dochází ke ztrátě kinetoplastu, k defekům na mitochondriální membráně, a také snižuje obsah Fe v buňce (Amisigo et al., 2019). Nevýhodou je opět její toxicita pro savčí buňky, která je ale prakticky stejná jako u již používaného léčiva (Berenil®) (Amisigo et al., 2019).

Obě výše zmíněné látky jsou chelátory schopné selektivně redukovat vnitrobuněčný obsah železa, které je esenciální pro mnoho buněčných pochodů Trypanosom (Amisigo et al., 2019). Přestože jsou většinou chelátory více toxické pro Trypanosomy než pro savčí buňky a stejně tak jsou toxická

i již užívaná léčiva, nepodařilo se stále vyřešit požadavek na ideální lék, který by byl selektivně jedovatý jen pro patogena (Amisigo et al., 2019).

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnutí stávajících poznatků o metabolismu železa u parazitického prvoka *Trypanosoma brucei* s důrazem na dvě nejvíce prozkoumaná stádia, a to na savčí krevní dlouhou formu a na hmyzí procyklické stádium. *T. brucei* se musí během svého životního cyklu přizpůsobovat v reakci na různá prostředí, s tím souvisí i rozdílné adaptace u obou forem.

Železo je přijímáno od hostitele či vektora a každá forma využívá jiný princip, kvůli jiným formám železa v prostředích. Tento kov je využíván jako kofaktor enzymů, je součástí energetického metabolismu a dýchání, dále se zřejmě účastní i detoxifikace volných kyslíkových radikálů a syntéze nukleových kyselin, jedná se tedy o esenciální prvek pro obě zkoumané formy.

Železo je také komponentem tak zvaných železo-sírných klastrů, které fungují jako kofaktory řady enzymů využitých v buňce. Fe/S klastry jsou syntetizovány v různých kompartmentech a to v mitochondrii a cytosolu a jedná se o esenciální součásti všech živých organismů. Proces jejich biosyntézy je poměrně dobře popsán, stále je zde však několik nepochopených jevů. Příkladem může být princip, jakým je do syntézy klastrů v mitochondrii zapojováno železo či jak probíhá samotné seskupení těchto komplexů. Cytosolická dráha navazuje na mitochondriální díky blíže nespecifikovaným, glutathion a síru obsahujícím, komponentům.

V souvislosti s železem by bylo dobré se zaměřit i na hem, který je přijímán z těla hostitele, protože *T. brucei* postrádá jeho biosyntetické dráhy. Hem byl v této práci zmíněn jen okrajově, vzhledem k jejímu omezenému rozsahu.

Jednou z velkých neznámých je dále například redistribuce železa mezi organelami v buňce, skladování a proces detoxifikace. Díky výzkumům provedených na blízkých příbuzných *Trypanosom* lze teoretizovat o tom, jak tyto procesy probíhají. Stále se však o těchto dějích ví relativně málo.

S jistotou můžeme říci, že je železo klíčovým prvkem pro přežití tohoto parazita. Pochopení principů metabolismu a využití železa u *T. brucei*, vede nejenom k získání nových informací, ale i k možnosti zdokonalení léčby spavé nemoci či nagany (zvířecí trypanozomiázy). Spavá nemoc sice v posledních letech oslabuje, stále se však jedná o nebezpečnou nemoc, která zásadně ovlivňuje životy lidí a ekonomickou situaci v chudé subsaharské Africe. Účinná léčba by proto mohla pomoci k úplnému vymýcení nemoci.

6. LITERATURA

- Acestor, N., Ziková, A., Dalley, R. A., Anupama, A., Panigrahi, A. K., Stuart, K. D. (2011). *Trypanosoma brucei* mitochondrial respiratome: Composition and organization in procyclic form. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(9), 1–14.
- Alfonzo, J. D., Lukeš, J. (2011). Assembling Fe/S-clusters and modifying tRNAs: Ancient co-factors meet ancient adaptors. *Trends in Parasitology*, 27(6), 235–238.
- Allen, J. W. A. (2011). Cytochrome c biogenesis in mitochondria: Systems III and V. *FEBS Journal*, 278(22), 4198–4216.
- Allen, J. W. A., Ferguson, S. J., Ginger, M. L. (2008). Distinctive biochemistry in the trypanosome mitochondrial intermembrane space suggests a model for stepwise evolution of the MIA pathway for import of cysteine-rich proteins. *FEBS Letters*, 582(19), 2817–2825.
- Alloatti, A., Gupta, S., Gualdrón-López, M., Nguewa, P. A., Altabe, S. G., Deumer, G., Wallemacq, P., Michels, P. A. M., Uttaro, A. D. (2011). Stearoyl-CoA desaturase is an essential enzyme for the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(2), 286–290.
- Amisigo, C. M., Antwi, C. A., Adjimani, J. P., Gwira, T. M. (2019). In vitro anti-trypanosomal effects of selected phenolic acids on *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, 14(5), 1–17.
- Anderson, G. J., Vulpe, C. D. (2009). Mammalian iron transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(20), 3241–3261.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Gradoni, L. (2003). The anti-parasitic effects of nitric oxide. *Cellular and molecular life sciences*, 55(10), 573–578.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M. J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Wang, H. (2009). TriTrypDB: A functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic Acids Research*, 38(1), 457–462.
- Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction: Controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 16(3), 347–358.
- Basu, S., Horáková, E., Lukeš, J. (2016). Iron-associated biology of *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(2), 363–370.
- Basu, S., Leonard, J. C., Desai, N., Mavridou, D. A. I., Tang, K. H., Goddard, A. D., Ginger, M. L., Lukeš, J., Allen, J. W. A. (2013). Divergence of Erv1-associated mitochondrial import and export pathways in trypanosomes and anaerobic protists. *Eukaryotic Cell*, 12(2), 343–355.
- Basu, S., Netz, D. J., Haindrich, A. C., Herlerth, N., Lagny, T. J., Pierik, A. J., Lill, R., Lukeš, J. (2014). Cytosolic iron-sulphur protein assembly is functionally conserved and essential in procyclic and bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 93(5), 897–910.
- Beattie, D. S., Obungu, V. H., Kiara, J. K. (1994). Oxidation of NADH by a rotenone and antimycin-sensitive pathway in the mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64(1), 87–94.
- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J. P. J., Sloof, P., Van Boom, J. H., Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46(6), 819–826.
- Benz, C., Kovářová, J., Králová-Hromadová, I., Pierik, A. J., Lukeš, J. (2016). Roles of the Nfu Fe–S targeting factors in the trypanosome mitochondrion. *International Journal for Parasitology*, 46(10), 641–651.

- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), 416–422.
- Besteiro, S., Barrett, M. P., Rivière, L., Bringaud, F. (2005). Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: Metabolism in flux. *Trends in Parasitology*, 21(4), 185–191
- Bienen, E. J., Hammadi, E., Hill, G. C. (1981). *Trypanosoma brucei*: Biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream to procyclic-trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 51(3), 408–417.
- Bienen, E. J., Maturi, R. K., Pollakis, G., Clarkson, A. B. (1993). Non - cytochrome mediated mitochondrial ATP production in bloodstream form *Trypanosoma brucei brucei*. *European Journal of Biochemistry*, 216(1), 75–80.
- Black, S. J., Mansfield, J. M. (2016). Prospects for vaccination against pathogenic African trypanosomes. *Parasite Immunology*, 38(12), 735–743.
- Bocedi, A., Dawood, K. F., Fabrini, R., Federici, G., Gradoni, L., Pedersen, J. Z., Ricci, G. (2010). Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. *The FASEB Journal*, 24(4), 1035–1042.
- Braymer, J. J., Lill, R. (2017). Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), 12754–12763.
- Breidbach, T., Krauth-Siegel, R. L., Steverding, D. (2000). Ribonucleotide reductase is regulated via the R2 subunit during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Letters*, 473(2), 212–216.
- Breidbach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R. L., Steverding, D. (2002). Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *International Journal for Parasitology*, 32(4), 473–479.
- Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology* 149(1), 1–9.
- Buchensky, C., Almirón, P., Mantilla, B. S., Silber, A. M., Cricco, J. A. (2010). The *Trypanosoma cruzi* proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 312(2), 133–141.
- Bursell, E. (1981). The role of proline in energy metabolism, 135-154. [online]. In: Downer, R.G.H. (edd), *Energy metabolism in Insects*, Springer. [cit.5.4.2020]. ISBN 978-1-4615-9221-1 Dostupné na: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-9221-1_5
- Caljon, G., Van Reet, N., De Trez, C., Vermeersch, M., Pérez-Morga, D., Van Den Abbeele, J. (2016). The dermis as a delivery site of *Trypanosoma brucei* for tsetse flies. *PLOS Pathogens*, 12(7), 1-22
- Cazzulo, J. J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB Journal*, 66(1), 1–15.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). African Trypanosomiasis. [online]. [cit.25.12.2019]. Dostupné na: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>
- Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., Krauth-Siegel, R. L. (2010). The dithiol glutaredoxins of African trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35224–35237.
- Chaudhuri, M., Ajayi, W., Hill, G. C. (1998). Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95(1), 53–68.

- Chaudhuri, M., Ott, R. D., Hill, G. C. (2006). Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*, 22(10), 484–491.
- Colasante, C., Peña Diaz, P., Clayton, C., Voncken, F. (2009). Mitochondrial carrier family inventory of *Trypanosoma brucei brucei*: Identification, expression and subcellular localisation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(2), 104–117.
- Coustou, V., Biran, M., Besteiro, S., Rivière, L., Baltz, T., Franconi, J. M., Bringaud, F. (2006). Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26832–26846.
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Rivière, L., Plazolles, N., Nolan, D., Barrett, M. P., Franconi, J. M., Bringaud, F. (2008). Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16343–16354.
- Creek, D. J., Mazet, M., Achcar, F., Anderson, J., Kim, D. H., Kamour, R., Morand, P., Millerioux, Y., Biran, M., Kerkhoven, E. J., Chokkathukalam, A., Weidt, S. K., Burgess, K. E. V., Breitling, R., Watson, D. G., Bringaud, F., Barrett, M. P. (2015). Probing the metabolic network in bloodstream-form *Trypanosoma brucei* using untargeted metabolomics with stable isotope labelled glucose. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1–25.
- Cross, G. A., Klein, R. A., Linstead, D. J. (1975). Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. *Parasitology*, 71(2), 311–326.
- De Steur, H., Blancquaert, D., Strobbe, S., Lambert, W., Gellynck, X., Van Der Straeten, D. (2015). Status and market potential of transgenic biofortified crops. *Nature Biotechnology*, 33(1), 25–29.
- Del Castillo-Rueda, A., Parham Khosravi-Shahi (2010). The role of iron in the interaction between host and pathogen. *Medicina Clinica*, 134(10), 452-456
- Dixon, S. J., Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, 10(1), 9–17.
- Dlouhy, A.C., Outen, C. E. (2013). The iron metallome in eukaryotic organisms, 241-278. [online]. In: Banci, L. (edd.), *Metallomics and the cell*, Springer. [cit. 20.5.2020]. ISBN 978-94-007-5561-1 Dostupné na: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-94-007-5561-1>
- Docampo, R. (2016). The origin and evolution of the acidocalcisome and its interactions with other organelles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 209(2), 3–9.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261.
- Doherty, C. P. (2007). Host-Pathogen Interactions: The Role of Iron. *The Journal of Nutrition*, 137(5), 1341–1344.
- Dormeyer, M., Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Krauth-Siegel, R. L. (2001). Trypanothione-dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* Ribonucleotide Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10602–10606.
- Durieux, P. O., Schütz, P., Brun, R., Köhler, P. (1991). Alterations in Krebs cycle enzyme activities and carbohydrate catabolism in two strains of *Trypanosoma brucei* during in vitro differentiation of their bloodstream to procyclic stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45(1), 19–27.
- Fenn, K., Matthews, K. R. (2007). The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 539–546.
- Figueiredo, L. M., Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P. (2017). Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle - review. [online]. F1000Research. [cit.3.3.2020]. Dostupné na: <https://f1000research.com/articles/6-683/v2>

- Gollhofer, J., Schläwicke, C., Jungnick, N., Schmidt, W., Buckhout, T. J. (2011). Members of a small family of nodulin-like genes are regulated under iron deficiency in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(5), 557–564.
- Gualdrón-López, M., Brennan, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A. J., Bringaud, F., Concepción, J. L., Michels, P. A. M. (2012). When, how and why glycolysis became compartmentalised in the *Kinetoplastea*. A new look at an ancient organelle. *International Journal for Parasitology*, 42(1), 1–20.
- Guerra, D. G., Decottignies, A., Bakker, B. M., Michels, P. A. M. (2006). The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(2), 155–169.
- Haindrich, A. C., Boudová, M., Vancová, M., Diaz, P. P., Horáková, E., Lukeš, J. (2017). The intermembrane space protein *Erv1* of *Trypanosoma brucei* is essential for mitochondrial Fe-S cluster assembly and operates alone. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 214, 47–51.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 10(2), 1–10.
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., Yue, P. X. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76.
- Hofer, A., Schmidt, P. P., Gräslund, A., Thelander, L. (1997). Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6959–6964.
- Horn, D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2), 123–129
- Huang, G., Ulrich, P. N., Storey, M., Johnson, D., Tischer, J., Tovar, J. A., Moreno, S. N. J., Orlando, R., Docampo, R. (2014). Proteomic Analysis of the Acidocalcisome, an organelle conserved from bacteria to human cells. *PLoS Pathogens*, 10(12), 1-18 .
- Iancu, T. C. (1992). Ferritin and hemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews*, 5(2), 209–229.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 247–281.
- Kakhlon, O., Cabantchik, Z. I. (2002). The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(8), 1037–1046.
- Kaplan, C. D., Kaplan, J. (2009). Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews*, 109(10), 4536–4552.
- Kell, D. B. (2009). Iron behaving badly: Inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases - review. *BMC Medical Genomics*, 2, 1–79.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kaplan, J., Guerinot, M. Lou. (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314(5803), 1295–1298.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins *Atm1p* and *Nfs1p* are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Journal*, 18(14), 3981–3989.
- Kontoghiorghes, G. J. (1995). Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. *Toxicology Letters*, 80(1–3), 1–18.

- Kořený, L., Oborník, M., Lukeš, J. (2013). Make it, take it, or leave it: Heme metabolism of parasites. *PLoS Pathogens*, 9(1), 1-6.
- Kovářová, J., Horáková, E., Changmai, P., Vancová, M., Lukeš, J. (2014). Mitochondrial and nucleolar localization of cysteine desulfurase Nfs and the scaffold protein Isu in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 13(3), 353–362.
- Kurz, T., Eaton, J. W., Brunk, U. T. (2011). The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(12), 1686–1697.
- Lai, D. H., Hashimi, H., Lun, Z. R., Ayala, F. J., Lukes, J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 1999–2004.
- Lander, N., Cordeiro, C., Huang, G., Docampo, R. (2016). Inorganic polyphosphate (polyP) physiology: Polyphosphate and acidocalcisomes. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 1–6.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1050–1055.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Mühlhoff, U., Kispal, G., Lill, R. (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Reports*, 2(8), 715–720.
- Laranjeira-Silva, M. F., Wang, W., Samuel, T. K., Maeda, F. Y., Michailowsky, V., Hamza, I., Liu, Z., Andrews, N. W. (2018). A MFS-like plasma membrane transporter required for *Leishmania* virulence protects the parasites from iron toxicity. *PLoS Pathogens*, 14(6), 1–24.
- Le Trant, N., Meshnick, S. R., Kitchener, K., Eaton, J. W., Cerami, A. (1983). Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 258(1), 125–130.
- Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M. V., Kaplan, J. (2001). CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–29519.
- Ligtenberg, M. J., Bitter, W., Kieft, R., Steverding, D., Janssen, H., Calafat, J., Borst, P. (1994). Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, 13(11), 2565–2573.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460(7257), 831–838.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biological Chemistry*, 380(10), 1157–1166.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., Paul, V. D., Pierik, A. J., Richter, N., Stümpfig, M., Srinivasan, V., Stehling, O., Mühlhoff, U. (2015). The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *European Journal of Cell Biology*, 94(7–9), 280–291.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C., Mühlhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1491–1508.
- Loiseau, L., Ollagnier-De Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M., Barras, F. (2005). Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26760–26769.

- Long, S., Jirků, M., Mach, J., Ginger, M. L., Sutak, R., Richardson, D., Tachezy, J., Lukeš, J. (2008). Ancestral roles of eukaryotic frataxin: Mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. *Molecular Microbiology*, 69(1), 94–109.
- Lüdemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H., Krauth-Siegel, R. L. (1998). *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Letters*, 431(3), 381–385.
- Lukeš, J., Basu, S. (2015). Fe/S protein biogenesis in trypanosomes - review. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(6), 1481–1492.
- Macedo, M. F., de Sousa, M. (2008). Transferrin and the transferrin receptor: Of magic bullets and other concerns. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 7(1), 41–52.
- Mach, J., Tachezy, J., Sutak, R. (2013). Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Parasitology*, 99(2), 363–364.
- Malvy, D., Chappuis, F. (2011). Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 986–995.
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., Radi, R. (2013a). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3199–3216.
- Manta B., Fleitas, L., Comini, M. (2012). Iron metabolism in pathogenic trypanosomes, 147-171. [online]. In: Arora, S. (edd.). *Iron Metabolism*, IntechOpen. [cit.15.5.2020]. ISBN 978- 953- 51- 0605- 0 Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/iron-metabolism/iron-metabolism-in-pathogenic-trypanosomes>
- Manta, B., Pavan, C., Sturlese, M., Medeiros, A., Crispo, M., Berndt, C., Krauth-Siegel, R. L., Bellanda, M., Comini, M. A. (2013b). Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: Molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(7), 665–682.
- Maslov, D. A., Opperdoes, F. R., Kostygov, A. Y., Hashimi, H., Lukeš, J., Yurchenko, V. (2019). Recent advances in trypanosomatid research: Genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology*, 146(1), 1–27.
- Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 118(2), 283–290.
- Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. A. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3369–3373.
- Mazet, M., Morand, P., Biran, M., Bouyssou, G., Courtois, P., Daulouède, S., Millerieux, Y., Franconi, J. M., Vincendeau, P., Moreau, P., Bringaud, F. (2013). Revisiting the central metabolism of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the mitochondrion is essential for parasite viability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(12), 1-15.
- McCord, J. M. Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- Merschjohann, K., Steverding, D. (2006). In vitro growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 5(3), 1–5.
- Michels, P. A. M., Bringaud, F., Herman, M., Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1463–1477.
- Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., De Souza, W. (2004b). Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist*, 155(4), 395–405.

- Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., Franzen, A., Attias, M., Vercesi, A., Plattner, H., Hentschel, J., De Souza, W. (2004a). Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochemistry and Cell Biology*, 121(5), 407–418.
- Moreno, S. N. J., Docampo, R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(3), 208–213.
- Netz, D. J. A., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlhoff, U., Pierik, A. J., Lill, R. (2010). Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 758–765.
- Nolan, D. P., Voorheis, H. P. (1992). The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0 - ATPase. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 207–216.
- Opperdoes, F. R. (1988). Glycosomes may provide clues to the import of peroxisomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 13(7), 255–260.
- Palmieri, F. (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(7–8), 564–578.
- Paris, Z., Changmai, P., Rubio, M. A. T., Ziková, A., Stuart, K. D., Alfonzo, J. D., Lukeš, J. (2010). The Fe/S cluster assembly protein Isd11 is essential for tRNA thiolation in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22394–22402.
- Paris, Z., Rubio, M. A. T., Lukeš, J., Alfonzo, J. D. (2009). Mitochondrial tRNA import in *Trypanosoma brucei* is independent of thiolation and the Rieske protein. *RNA*, 15(7), 1398–1406.
- Peña-Díaz, P., Lukeš, J. (2018). Fe–S cluster assembly in the supergroup *Excavata*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(4), 521–541.
- Povelones, M. L. (2014). Beyond replication: division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 196(1), 53–60.
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., Valenti, P. (2017). Lactoferrin: A natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1–26.
- Rouault, T. A., Maio, N. (2017). Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), 12744–12753.
- Ruprecht, J. J., Kunji, E. R. S. (2020). The SLC25 mitochondrial carrier family: structure and mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(3), 244–258.
- Saas, J., Ziegelbauer, K., Von Haeseler, A., Fast, B., Boshart, M. (2000). A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2745–2755.
- Sarkar, A., Andrews, N. W., Laranjeira-Silva, M. F. (2019). Intracellular iron availability modulates the requirement for *Leishmania* Iron Regulator 1 (LIR1) during macrophage infections. *International Journal for Parasitology*, 49(6), 423–427.
- Schell, D., Borowy, N. K., Overath, P. (1991). Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Research*, 77(7), 558–560.
- Schneider, A., Bouzaidi-Tiali, N., Chanez, A. L., Bulliard, L. (2007). ATP production in isolated mitochondria of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Methods in Molecular Biology*, 372(3), 379–387.

- Schupp, T., Waldmeier, U., Divers, M. (1987). Biosynthesis of desferrioxamine B in *Streptomyces pilosus* : Evidence for the involvement of lysine decarboxylase. *FEMS Microbiology Letters*, 42(2-3), 135–139.
- Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Saimoto, H., Moore, A. L., Harada, S., Kita, K. (2013). Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4580–4585.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 26944–26949.
- Smíd, O., Horáková, E., Vilímová, V., Hrdy, I., Cammack, R., Horváth, A., Lukes, J., Tachezy, J. (2006). Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28679–28686.
- Srinivasan, V., Pierik, A. J., Lill, R. (2014). Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science*, 343(6175), 1137–1140.
- Stehling, O., Mascarenhas, J., Vashisht, A. A., Sheftel, A. D., Niggemeyer, B., Rösser, R., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A., Lill, R. (2013). Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metabolism*, 18(2), 187–198.
- Steverding, D., Stierhof, Y. D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A. G., Overath, P. (1994). ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *European Journal of Cell Biology*, 64(1), 78–87.
- Steverding, Dietmar. (1997). Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* require only small amounts of iron for growth. *Parasitology Research*, 84(1), 59–62.
- Steverding, Dietmar. (2000). The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology International*, 48(3), 191–198.
- Stijlemans, B., Beschin, A., Magez, S., Van Ginderachter, J. A., De Baetselier, P. (2015). Iron homeostasis and *Trypanosoma brucei* associated immunopathogenicity development: A battle/quest for iron - review. *BioMed Research International*, 2015, 1-15
- Stijlemans, B., Vankrunkelsven, A., Brys, L., Magez, S., De Baetselier, P. (2008). Role of iron homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. *Immunobiology*, 213(9–10), 823–835.
- Surve, S., Heestand, M., Panicucci, B., Schnauffer, A., Parsons, M. (2012). Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 183–193.
- Takahashi, Y., Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in *Archaea* and plastids. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 28380–28383.
- Tanaka, T., Abe, Y., Inoue, N., Kim, W. S., Kumura, H., Nagasawa, H., Igarashi, I., Shimazaki, K. I. (2004). The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(6), 619–625.
- Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Mota, M. M., Figueiredo, L. M. (2017). Adipose tissue: A safe haven for parasites? *Trends in Parasitology*, 33(4), 276–284.
- Taylor, M. C., Kelly, J. M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology*, 137(6), 899–917.

- Taylor, Martin C., Mclatchie, A. P., Kelly, J. M. (2013). Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue. *Molecular Microbiology*, 89(3), 420–432.
- Tielens, A. G. M., Van Hellemond, J. J. (1998). Differences in energy metabolism between *Trypanosomatidae*. *Parasitology Today*, 14(7), 265–272.
- Tonini, M. L., Peña-Díaz, P., Haindrich, A. C., Basu, S., Kriegová, E., Pierik, A. J., Lill, R., MacNeill, S. A., Smith, T. K., Lukeš, J. (2018). Branched late-steps of the cytosolic iron-sulphur cluster assembly machinery of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 14(10), 1-31.
- Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S. A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., Ribeiro, R. M., Dias, S., Smith, T. K., Figueiredo, L. M. (2016). *Trypanosoma brucei* parasites occupy and functionally adapt to the adipose tissue in mice. *Cell Host and Microbe*, 19(6), 837–848.
- Tripodi, K. E. J., Menendez Bravo, S. M., Cricco, J. A. (2011). Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways - review. *Enzyme Research*, 2011(1), 1-12.
- Tsaousis, A. D. (2019). On the origin of iron/sulfur cluster biosynthesis in *Eukaryotes*. *Frontiers in Microbiology*, 2478(10), 1-10.
- Tsaousis, A. D., Gentekaki, E., Eme, L., Gaston, D., Roger, A. J. (2014). Evolution of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery in *Blastocystis* species and other microbial eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, 13(1), 143–153.
- Van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R., Tielens, A. G. M. (2005b). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions*, 33(5), 967–971.
- Van Hellemond, Jaap J., Bakker, B. M., Tielens, A. G. M. (2005a). Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. *Advances in Microbial Physiology*, 50, 199–226.
- Van Hellemond, Jaap J., Opperdoes, F. R., Tielens, A. G. M. (1998). *Trypanosomatidae* produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3036–3041.
- Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M. J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S. K., Pays, E. (2008). A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science*, 320(5876), 677–681.
- Verner, Z., Basu, S., Benz, C., Dixit, S., Dobáková, E., Faktorová, D., Hashimi, H., Horáková, E., Huang, Z., Paris, Z., Peña-Díaz, P., Ridlon, L., Týč, J., Wildridge, D., Zíková, A., Lukeš, J. (2015). Malleable mitochondrion of *Trypanosoma brucei*-review. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 315, 73–151.
- Verner, Z., Čermáková, P., Škodová, I., Kováčová, B., Lukeš, J., Horváth, A. (2014). Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* and procyclic stage of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(1), 55–65.
- Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin*, 41(2), 105-114.
- Visser, N., Opperdoes, F. R., Borst, P. (1981). Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, 118(3), 521–526.
- Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, 460(7257), 823–830.
- Weiner, J., Kooij, T. W. A. (2016). Phylogenetic profiles of all membrane transport proteins of the malaria parasite highlight new drug targets. *Microbial Cell*, 3(10), 511–521.

- Wheeler, R. J., Gull, K., Sunter, J. D. (2019). Coordination of the cell cycle in Trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 133–154.
- World Health Organisation. (2019). WHO publishes new guidelines for the treatment of sleeping sickness. [online]. [cit. 25.11.2019] Dostupné na: <https://www.who.int/news-room/detail/08-08-2019-who-publishes-new-guidelines-for-the-treatment-of-sleeping-sickness>.
- World Health Organisation. (2020). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [online]. [cit.9.2.2020]. Dostupné na: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)).
- Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Ahmed, A., Horn, D., Kelly, J. M. (2006). Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(2), 198–209.
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82–83, 969–974.
- Zheng, F., Colasante, C., Voncken, F. (2019). Characterisation of a mitochondrial iron transporter of the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 233(7),1-13.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Dean, D. R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry*, 33(15), 4714–4720.
- Zíková, A., Schnauffer, A., Dalley, R. A., Panigrahi, A. K., Stuart, K. D. (2009). The F0F1-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 5(5), 1-16.