

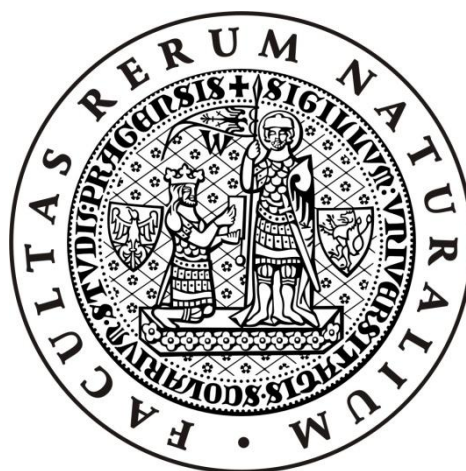
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Kateřina Pilařová

Charakterizace železo-sirných flavoproteinů z hydrogenosomu

Trichomonas vaginalis

Characterization of hydrogenosomal iron-sulfur flavoproteins from

Trichomonas vaginalis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

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

V Praze, dne

.....

Tato práce byla spolufinancována z grantu GA UK 407911.

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat Tamaře Smutné za pomoc s prvními krůčky v laboratoři, s pozdějším během na dlouhou trať v průběhu mé diplomové práce a se závěrečným sprintem při dokončování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Ivanovi Hrdému především a doslova za pevné nervy, důvěru a knowhow. Také velmi děkuji svým rodičům a svému příteli za bezmeznou podporu, pomoc a pochopení. Mé další díky patří také Neri C. Beltrán a Petrovi Jedelskému za proteomická data, Štěpánce Hrdé za sekvenace a mnoha dalším. A nesmím zde také zapomenout poděkovat celé naší laboratoři molekulární a biochemické parazitologie za velmi přátelské prostředí a podporu.

OBSAH

ABSTRAKT	1
ABSTRACT	2
1 Seznam použitých zkratek	3
2 Úvod	4
3 Literární přehled	5
3.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
3.2 Morfologie <i>Trichomonas vaginalis</i>	6
3.3 Hydrogenosom	7
3.3.1 Metabolismus hydrogenosomu	9
3.4 <i>Trichomonas vaginalis</i> a kyslík	12
3.5 <i>Trichomonas vaginalis</i> a metronidazol	14
3.6 <i>Methanosarcina thermophila</i> , železosírné flavoproteiny a oxidativní stres	16
3.7 <i>Trichomonas vaginalis</i> a železosírné flavoproteiny	17
4 Cíle diplomové práce	18
5 Materiály a metody	19
5.1 Zásobní rozkoky a pufry	19
5.1.1 Kultivace	19
5.1.2 2D elektroforéza	20
5.1.3 Barvení gelu stříbřením	21
5.1.4 Western blotová analýza	22
5.1.5 Protilátky	23
5.1.6 Imunofluorescence	23
5.1.7 Izolace proteinů	23
5.1.8 Izolace hydrogenosomů	25
5.1.9 Biochemie	25
5.2 Použité organismy	25
5.2.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
5.2.2 <i>Escherichia coli</i>	26
5.3 Použité geny a proteiny	26
5.4 Použité primery	27
5.5 Použité experimentální metody	28

5.5.1 PCR	28
5.5.2 Analýza vzorků DNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu	29
5.5.3 Ligace do pGEM® - T easy vektoru	29
5.5.4 Transformace <i>E. coli</i>	29
5.5.5 DNA Miniprep	30
5.5.6 Štěpení vektoru	30
5.5.7 Extrakce DNA z agarózového gelu	30
5.5.8 Ligace do expresního vektoru pET-42b	30
5.5.9 SDS proteinová elektroforéza	31
5.5.10 Barvení gelu stříbřením	32
5.5.11 Western blotová analýzy	32
5.5.12 2D elektroforéza	32
5.5.13 Imunodetekce proteinu na nitrocelulózové membráně	33
5.5.14 DNA Midiprep	33
5.5.15 Elektroporace trichomonád	3
5.5.16 Imunofluorescence	34
5.5.17 Nativní izolace rekombinantního proteinu ISF	35
5.5.18 Izolace hydrogenosomů	35
5.5.19 Izolace rekombinantního feredoxinu TvFdx	37
5.5.20 Izolace PFO z buněk <i>T. vaginalis</i>	37
5.5.21 Stanovení proteinů ve vzorcích	38
5.5.22 Stanovení nativní molekulové hmotnosti ISF	38
5.5.23 Charakterizace kofaktoru ISF	39
5.5.24 Charakterizace železosírného centra	40
5.5.25 Stanovení koncentrace železa v proteinu	40
5.5.26 Stanovení aktivity pyruvát:feredoxin oxidoreduktázy (PFO)	40
5.5.27 Stanovení aktivity ISF3	41
5.5.28 qRT-PCR	41
6 Výsledky	44
6.1 qRT-PCR	44
6.2 Izolace ISF3	45
6.3 Stanovení molekulové hmotnosti ISF3	47

6.4 Charakterizace kofaktoru	48
6.5 Lokalizace ISF3 v buňkách <i>T. vaginalis</i>	49
6.5.1 Lokalizace nepřímou fluorescencí	49
6.5.2 Lokalizace Western blotovou analýzou	50
6.6 Kontrola specificity protilátky proti ISF3 pomocí 2D elektroforézy	50
6.7 Exprese ISF3 v <i>T. vaginalis</i> rezistentní k metronidazolu	52
6.8 Izolace PFO	53
6.9 Stanovení aktivity ISF3	54
7 Diskuse	58
8 Závěr	63
9 Seznam použité literatury	65

ABSTRAKT

Trichomonas vaginalis je bičíkatý mikroaerofilní prvok ze skupiny Excavata, který způsobuje trichomoniázu, nejčastější nevírovou sexuálně přenosnou nemoc na světě, která kromě vaginitidy u žen a uretritidy u mužů může způsobovat například i problémy v těhotenství. Tato práce se zabývá charakterizací železosírných flavoproteinů (ISF), které byly nalezeny v proteomu hydrogenosomu *T. vaginalis*. Konkrétně jsme se zaměřili na ISF3, který je podle našich výsledků dimerní protein a který ve svém aktivním centru váže flavin mononukleotid (FMN) a železosírné centrum, jehož složení jsme doposud neurčili. ISF3 je schopný redukovat kyslík, peroxid vodíku, dusičnan sodný ale také metronidazol a to i v enzymatickém systému ISF3 – PFO – feredoxin. Dále jsem se také pokusila zredukovat pomocí ISF3 síran amonný, ošem neúspěšně. Tyto výsledky korespondují s aktivitami ISF u *Methanosarcina thermophila*, kde ISF redukuje kyslík a peroxid vodíku na vodu. ISF3 je ovšem navíc schopen redukovat dusíkaté sloučeniny, což je důležitý fakt vzhledem k tomu, že metronidazol je léčivo ze skupiny 5-nitroimidazolů. Z dalších výsledků navíc vyplývá, že dochází k poklesu exprese ISF3 u trichomonád rezistentních k metronidazolu. Nelze tedy vyloučit, že je ISF3 jedním z dalších enzymů podílejících se na redukcí metronidazolu a tudíž že by pokles jeho exprese mohl být součástí vývoje rezistence trichomonády k metronidazolu.

Klíčová slova: *Trichomonas vaginalis*, hydrogenosom, FeS klastr, flavin mononukleotid, železosírné flavoproteiny

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is flagelated microaerophilic protozoan parasite from Excavata group, which causes trichomoniasis, the most common nonviral sexually transmitted disease in the world. It causes vaginitis in women and urethritis in man and it can also cause problems for example during pregnancy. This thesis is aimed on the characterisation of hydrogenosomal iron-sulfur flavoproteins (ISF) from *Trichomonas vaginalis*, proteins, which were only recently discovered in the proteome of hydrogenosome of *T. vaginalis*. Specifically, we have focused on characterisation of ISF3 which is, according to our data, active homodimer and binds flavin mononucleotide (FMN) and iron-sulphur centre in its active site. The iron-sulphur centre is not characterised yet. ISF3 is able to reduce oxygen, hydrogen peroxide, sodium nitrate and metronidazole also in the enzymatic system with PFO and ferredoxin. Next, I tried to reduce ammonium sulphate with ISF3, but unsuccessfully. These results correspond with the activities obtained for ISF from *Methanosarcina thermophila*, where ISF reduces oxygen and hydrogen peroxide to water. In addition, ISF3 is able to reduce nitrogen compounds. It is important according to the fact, that metronidazole is a drug from the group of 5-nitroimidazoles. The other results show the decrease of expression of ISF3 in trichomonads resistant to metronidazole. Thus it cannot be excluded that ISF3 is another enzyme contributing to metronidazole reduction and thus the decrease in its expression could be a part of the development of resistance in trichomonads to metronidazole.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, hydrogenosome, FeS cluster, flavin mononucleotide, iron-sulfur flavoproteins

1 Seznam použitých zkratek

BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomasie Brilliant Blue R-250
cDNA	komplementární DNA
CoA	koenzym A
CODH - ACS	komplex CO - dehydrogenázy - acetyl - CoA - syntázy
DAB	diaminobenzidin
dNTP	dinukleotid trifosfáty
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavin adenin dinukleotid
FDP	"flavodiiron" protein
FMN	flavin mononukleotid
IM	izolační médium
ISF	iron sulfur flavoprotein (železosirný – FeS – flavoprotein)
ISF3-Ha	FeS flavoprotein 3 značený hemaglutininovým tagem
ISF3-His	železosirný flavoprotein 3 značený His-tagem
ME	malic enzyme (jablečný enzym)
MV	metylviologen
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFO	pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
pI	izoelektrický bod
qRT-PCR	kvantitativní Real-Time PCR
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	sodium dodecil sulfát
SDS-PAGE	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SOD	superoxid dismutáza
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TLCK	tosyl-lysin-chlormetylketon
TRIZOL	Total RNA Isolation Reagent
TvFdx	ferredoxin z <i>Trichomonas vaginalis</i>

2 Úvod

Trichomoniáza je nejčastější nevírové sexuálně přenosné onemocnění na světě, způsobené mikroaerofilním bičíkatým prvokem *Trichomonas vaginalis*. Každoročně se jím nakazí 170 miliónů lidí. Tato nemoc je často spojována i s dalšími komplikacemi například v těhotenství. Jedinými povolenými léčivy jsou chemoterapeutika ze skupiny 5-nitroimidazolů s nejčastěji používaným metronidazolem. Klinická rezistence k tomuto léku se nevyskytuje příliš často, k vývoji rezistence ale přesto dochází.

Nejen z těchto důvodů je důležité tohoto prvoka důkladně zkoumat, popsat jeho metabolismus a mechanismus získání rezistence. Také proto je tématem mé práce charakterizace železosírných flavoproteinů z hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis*, což by mělo přispět k doplnění znalostí o metabolických vlastnostech hydrogenosomu.

3 Literární přehled

3.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis je mikroaerofilní bičíkatý prvok, který způsobuje vaginitidu u žen a uretritidu u mužů. U žen se ve spojení s nákazou *T. vaginalis* mohou dále objevit problémy v těhotenství. Může docházet k předčasným porodům, dítě se rodí s nízkou porodní váhou (Cotch *et al.*, 1997; Hardy *et al.*, 1984; Minkoff *et al.*, 1984) a může dojít i k úmrtí dítěte. Nákaza *T. vaginalis* je také občas spojována se zvýšeným rizikem přenosu HIV / AIDS (Laga *et al.*, 1993; Laga *et al.*, 1994) a s rakovinou děložního hrdla (Dunne *et al.*, 2003; Gram *et al.*, 1992; Kharsany *et al.*, 1993; Zhang & Begg, 1994). Onemocnění může také vyústit až v neplodnost ženy (Grodstein *et al.*, 1993).

Trichomoniáza je nejčastější nevirová sexuálně přenosná nemoc na světě s incidencí 170 milionů nakažených ročně (Wisdom & Dunlop, 1965; Fouts & Kraus, 1980; WHO, 2001; Johnston & Mabley, 2008).

K léčbě trichomoniázy se používají deriváty 5-nitroimidazolů, jako je například metronidazol, který lze použít nejen k léčbě tohoto onemocnění, ale též dalších nemocí způsobených anaerobními prvky nebo bakteriemi. Mechanismus účinku metronidazolu spočívá v jeho redukci na volné radikály, které následně poškozují buněčné struktury (Edwards, 1993b).

Trichomonády jsou mikroaerofilní eukaryotické organismy. Místo klasické mitochondrie mají hydrogenosom, organelu anaerobního metabolismu, která sdílí evolučního předka s mitochondrií (Bui *et al.*, 1996; Bozner, 1997; Dyll & Johnson, 2000; van der Giezen *et al.*, 2002). I když jsou hydrogenosomy příbuzné mitochondrii, postrádají řadu biochemických procesů pro ni charakteristických. Ty hydrogenosom pravděpodobně ztratil v důsledku adaptace jeho majitelů na anaerobní styl života. Zároveň ale v hydrogenosomu nalezneme i enzymy, které postrádá mitochondrie, především pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu (PFO) a hydrogenázu. Na druhou stranu najdeme ale také proteiny a enzymy, které mají tyto organely společné, například feredoxin, sukcinát thiokinázu, adenylát kinázu, komponenty glycin dekarboxylázového systému (Johnson *et al.*, 1990; Mukherjee *et al.*, 2006) a systém syntézy Fe-S center (Šuťák *et al.*, 2004).

3.2 Morfologie *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis je bičíkatý prvok, který patří do skupiny Excavata, kmene Parabasala (Cavalier – Smith, 2004).

Trichomonáda je eukaryotická buňka o velikosti přibližně 10 x 7 μm (Honigberg & King, 1964), kulovitého až améboidního tvaru, obalená cytoplasmatickou membránou. Tvar buňky záleží na tom, zda se vyskytuje v axenické kultuře (Arroyo *et al.*, 1993) a nebo je přichycena k vaginálním epiteliálním buňkám. U trichomonád je známo pouze stádium trofozoita, nikoliv cysty (Heath, 1981; Arroyo *et al.*, 1993).

Trichomonáda má pět bičíků, z nichž jeden je zpětný a propojením s cytoplasmatickou membránou tvoří undulující membránu. Zbylé čtyři bičíky, umístěné v přední části buňky, jsou volné (Honigberg & King, 1964; Warton & Honigberg, 1979; Arroyo *et al.*, 1993).

Podél undulující membrány probíhá žíhaná struktura mikrotubulů zvaná costa. Rozlišujeme dva typy costy, typ A a B, které se od sebe liší v typu žíhání a v uchycení na kinetosom. Trichomonády mají costu typu B (Brugerolle, 1975-76).

Bičíky a jejich bazální tělíska s centrosomy jsou umístěny v apikální části buňky a tvoří strukturu zvanou mastigont, se kterým jsou propojené další mikrotubulární struktury – pelta a axostyl. Axostyl je nekontraktilní a stejně jako pelta je tvořen jednou vrstvou vzájemně propojených mikrotubulů, které se v případě axostylu stáčí do trychtýře, v jehož ústí sedí jádro (Brugerolle, 1975-76). Další nápadnou žíhanou strukturou v buňce trichomonády je parabazální fibrila, která spolu s Golgiho komplexem tvoří takzvaný parabazální aparát (Brugerolle, 1975-76, Kulda *et al.*, 1986).

Jádro trichomonády je haploidní, obsahuje šest telocentrických chromozómů (Samuels, 1980; Drmota & Král, 1997) a dělí se specifickou extranukleární uzavřenou mitózou, kdy při mitóze zůstává zachována jaderná membrána (Brugerolle, 1975).

Hydrogenosomy trichomonády se v buňce nacházejí typicky umístěné perinukleárně a dále podél costy a axostylu (Lindmark & Müller, 1973; Benchimol *et al.*, 1996).

V cytoplasmě trichomonád také najdeme drsné endoplasmatické retikulum, glykogenová granula sloužící jako zásobárna energie pro glykolýzu, a různé váčky a vakuoly, které vznikly fagocytózou nebo pinocytózou (Brugerolle, 1972; Brugerolle, 1975-76; Benchimol *et al.*, 1981).

3.3 Hydrogenosom

Jak již bylo zmíněno, trichomonády nemají klasickou mitochondrii, ale mají hydrogenosom, organelu anaerobního metabolismu. Za anaerobních podmínek produkuje hydrogenosom vodík oxidací pyruvátu nebo malátu (Müller, 1993).

Hydrogenosom byl nalezen také u dalších anaerobních nebo mikroaerofilních protist, volně žijících (Finlay & Fenchel, 1989; Fenchel & Finlay, 1991) i bachorových nálevníků (Yarlett *et al.*, 1981; Snyers *et al.*, 1982; Yarlett *et al.*, 1983, Yarlett *et al.*, 1984), nebo chytridiomycet (Yarlett *et al.*, 1986).

Hydrogenosom je kulovitého tvaru o velikosti přibližně 0,5 μm a je ohraničen dvěma těsně přiléhajícími membránami, mezi kterými se někdy vyskytují mezimembránové váčky obsahující Ca^{2+} (Benchimol & deSouza, 1983; Honigberg *et al.*, 1984). Hydrogenosom má granulární matrix často s elektrondensním jádrem (obr. 1).

Hydrogenosomy vznikají dělením původních hydrogenosomů a to třemi různými způsoby: segmentací, vytvořením přepážky, a nebo přes takzvaný srdcovitý tvar (Benchimol *et al.*, 1996). Při segmentaci dochází k prodloužení hydrogenosomu a následnému zúžení ve střední části a k odškrcení. V druhém případě dochází k invaginaci vnitřní hydrogenosomální membrány a k vytvoření přepážky, která rozdělí hydrogenosomální matrix na dvě části (Larsen, 1970; Tandler & Hoppel, 1973). Při třetím způsobu dělení hydrogenosomu dochází ke zvětšení anteriorní části hydrogenosomu a postupné invaginaci membrány v přední části, netvoří se žádné septum, ani se organela nijak neprodlužuje (Benchimol & Engelke, 20003). Hydrogenosomy nevznikají pučením od endoplasmatického retikula (ER), i když bylo pozorováno, že se vyskytují v jeho těsné blízkosti (Benchimol *et al.*, 1996). Předpokládá se totiž, že ER poskytuje hydrogenosomu nové fosfolipidy, které hydrogenosom potřebuje na zabudování do membrány, když se dělí a zvětšuje se (Benchimol *et al.*, 1996).

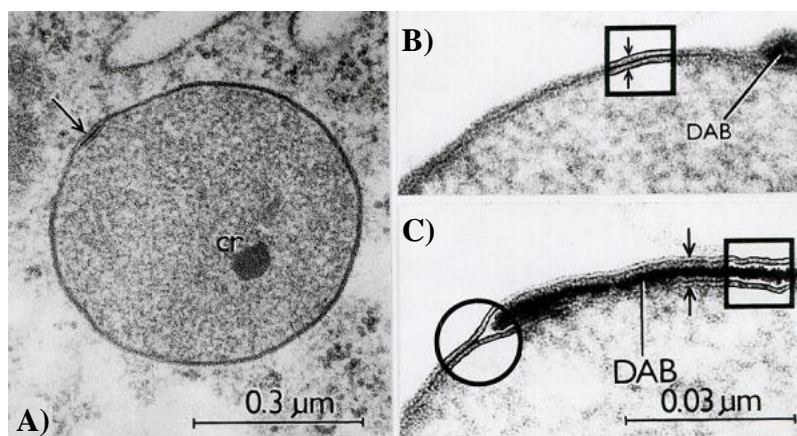
Hydrogenosom trichomonád nemá oproti mitochondrii žádnou DNA (Clemens & Johnson, 2000). Trichomonáda proto kóduje geny pro hydrogenosomální proteiny jadernou DNA. Proteiny syntetizuje v cytosolu na volných polyribosomech a následně je transportuje do hydrogenosomu (Lahti & Johnson, 1991). Ukázalo se, že trichomonáda pro transport proteinů do hydrogenosomu používá oba transportní mechanismy, které jsou známy u mitochondrie. A to jak N – terminální sekvenci, která slouží jako importní signál do hydrogenosomu pro matrixové proteiny a během transportu je odštěpena (Johnson *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1993; Lahti *et al.*, 1992; Hrdý & Müller, 1995a; Plumper *et al.*, 1998),

tak také vnitřní signální sekvenci přítomnou patrně především (ale ne výlučně) v proteinech, které jsou lokalizovány do vnitřní hydrogenosomální membrány (Pfanner & Geissler, 2001). Ve většině případů je klasická hydrogenosomální signální sekvence bohatá na leucin, serin a treonin. Leucin je na 2. pozici za prvním (iniciátorovým) metioninem, arginin na pozici -2 nebo -3 od místa štěpení a asparagin nebo fenylalanin se vyskytuje na pozici -1 od místa štěpení. Hydrogenosomální signální sekvence je bohatá na hydrofobní a hydroxylované aminokyseliny (Johnson *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1993; Lahti & Johnson, 1991; Hrdý & Müller, 1995a). Od mitochondriální signální sekvence se liší hlavně v délce sekvence. Zatímco mitochondriální signální sekvence je dlouhá 20 – 80 aminokyselin, hydrogenosomální signální sekvence je obvykle dlouhá 5 – 12 aminokyselin (Johnson *et al.*, 1995). K transportu proteinu do hydrogenosomu je zapotřebí ATP, elektrochemický gradient (Bradley *et al.*, 1997) a membránové transportéry (Plumper *et al.*, 2000).

Příklad hydrogenosomálních signálních sekvencí (Johnson *et al.*, 1990; Hrdý & Müller, 1995a; Hrdý & Müller, 1995b):

Feredoxin	MLSQVCRF
Malic enzyme 1	MLTSSVSVPRN

■ – aminokyseliny v konzervované poloze



Obr. 1: Hydrogenosom (Čerkasová *et al.*, 1973). A, hydrogenosom – granulární matrix, elektrondensní kore (cr), mezimembránový měchýřek bohatý na vápník; B, těsně přiléhající membrány hydrogenosomu; C, detail mezimembránového měchýřku s uloženým vápníkem.

3.3.1 Metabolismus hydrogenosomu

Metabolismus hydrogenosomu je nejlépe prostudován právě u trichomonád (obr. 2). Jeho hlavní funkcí je oxidativní dekarboxylace pyruvátu nebo malátu reakcí, která je spojena s produkcí ATP a tvorbou vodíku (Müller, 1993). Zdrojem pyruvátu pro hydrogenosom je glykolýza v cytosolu. Hydrogenosom může ovšem metabolizovat i malát. Malát je po vstupu do hydrogenosomu oxidativně dekarboxylován na pyruvát hydrogenosomálním jablečným enzymem (Hrdý & Müller, 1995a; Drmota *et al.*, 1996).

Klíčovým enzymem dekarboxylace pyruvátu je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), která katalyzuje jeho oxidaci na acetyl-CoA, vzniká CO₂ (Lindmar & Müller, 1973; Williams *et al.*, 1987). CoA je dále přenesen na sukcinát, vzniká sukcinyl-CoA a konečným produktem této reakce je acetát, reakce je katalyzována acetát:sukcinát CoA transferázou. Sukcinyl-CoA je, díky své thioesterové vazbě, substrátem pro fosforylaci ADP na ATP pomocí sukcinát thiokinázy, CoA se recykluje (Jenkins *et al.*, 1991). Elektrony, které se uvolňují v reakci katalyzované PFO, jsou odebrány ferredoxinem a dále hydrogenázou přeneseny na protony a tím vzniká molekulární vodík (Müller, 1993). Celkově je tedy na tvorbu jedné molekuly ATP zapotřebí jedna molekula pyruvátu a konečnými produkty metabolismu jsou acetát, vodík a CO₂ (Müller, 1993).

PFO má stejnou funkci jako pyruvát dehydrogenázový komplex v mitochondrii – katalyzuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu. Vzniká acetyl-CoA, CO₂ a dva elektrony. PFO je homodimer, jehož každá subjednotka má 120 kDa, a je těsně spojený s hydrogenosomální membránou (Williams *et al.*, 1987; Hrdý & Müller, 1995). Obsahuje nekovalentně navázaný thiamin pyrofosfát, několik [4Fe4S] klastrů a možná ještě i další typy FeS klastrů (Williams *et al.*, 1987). Po dokončení genomového projektu *T. vaginalis* se ukázalo, že trichomonáda v genomu kóduje sedm homologních genů tohoto proteinu, které lze rozdělit do dvou skupin (Carlton *et al.*, 2007). Šest z nich je pravděpodobně exprimovaných (Schneider *et al.*, 2011).

Nejdůležitějším přenašečem elektronů v hydrogenosomu je ferredoxin, malý protein o molekulové hmotnosti cca 10 kDa, který mimo jiné předává elektrony získané v reakci katalyzované PFO na hydrogenázu, která produkuje molekulární vodík. Ferredoxin *T. vaginalis* má [2Fe2S] klastr (Gorrell *et al.*, 1984) a redoxní potenciál -347 mV (Vidakovič *et al.*, 1996), čímž se podobá ferredoxinům z aerobních bakterií a z mitochondrií (Coombs & Müller, 1995).

Dalším charakteristickým enzymem hydrogenosomu je hydrogenáza, která využívá ferredoxin jako donor elektronů (Lindmark & Müller, 1973). Hydrogenáza *T. vaginalis* byla

identifikována jako [FeFe] hydrogenáza (Payne *et al.*, 1993), tento typ hydrogenázy je typický například pro bakterie *Clostridium pasteurianum* a *Desulfovibrio vulgaris* (Yagi *et al.*, 1985; Meyer & Gagnon, 1991). *T. vaginalis* kóduje ve svém genomu čtrnáct homologů hydrogenázy, přičemž tato multiplicita je pro hydrogenosomální enzymy celkem typická (Carlton *et al.*, 2007). Ovšem pouze pět z nich bylo nalezeno v proteomu hydrogenosomu trichomonády (Schneider *et al.*, 2011).

Hydrogenosomální jablečný enzym (malát dehydrogenáza dekarboxylující) je nejvíce exprimovaný protein hydrogenosomu. Katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát. Jako akceptor elektronů používá přednostně NAD^+ (Drmota *et al.*, 1996). Hydrogenosomální jablečný enzym díky své velikosti 63 kDa patří k rodině eukaryotických jablečných enzymů (Doležal *et al.*, 2004) a je vázaný na membránu (Drmota *et al.*, 1996). Genom *T. vaginalis* kóduje devět homologů tohoto proteinu (Carlton *et al.*, 2007).

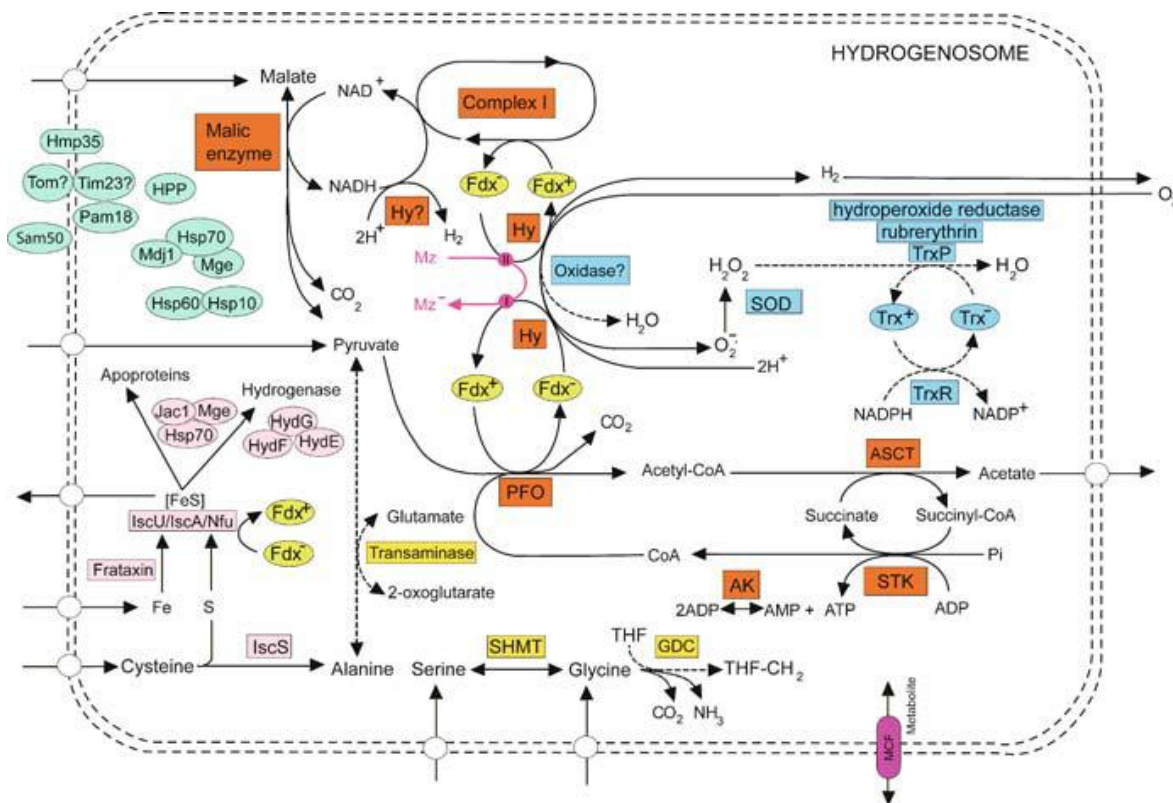
NADH dehydrogenáza je jediná zachovaná komponenta dýchacího řetězce mitochondrie v hydrogenosomu trichomonády a zároveň je to nejredukovanější zbytek komplexu 1, který je doposud znám. Skládá se ze dvou katalytických subjednotek (Dyall *et al.*, 2004; Hrdý *et al.*, 2004; Carlton *et al.*, 2007). NADH dehydrogenáza může redukovat například feredoxin, ale také takové molekuly jako je ubiquinon. NADH dehydrogenáza je důležitým enzymem pro regeneraci NAD^+ – reoxiduje NADH, které vzniká při oxidaci malátu (Hrdý *et al.*, 2004).

Hydrogenosom je organela anaerobního metabolismu trichomonády, ukázalo se ovšem, že *T. vaginalis* je tolerantní k nízkým koncentracím kyslíku (Paget & Lloyd, 1990). Kyslík se může stát terminálním akceptorem elektronů a zastavuje se tak produkce molekulárního vodíku. Redukce kyslíku ovšem u trichomonád není spjata s produkcí ATP, jak je tomu v mitochondrii. ATP trichomonáda generuje substrátovou fosforylací. Ostatní metabolické procesy, jako je produkce acetátu a CO_2 , zůstávají při respiraci zachovány (Lloyd & Kristensen, 1985; Lloyd & Pedersen, 1985).

Hydrogenosom je důležitý nejen z hlediska metabolismu, ale také z hlediska biomedicínského. Dochází zde totiž k aktivaci metronidazolu, léčiva ze skupiny 5-nitroimidazolů, na jeho cytotoxické radikály, které následně poškozují buněčné struktury. Metronidazol se do buňky dostává pasivní difuzí a v hydrogenosomu pak slouží jako přednostní akceptor elektronů od feredoxinu na úkor hydrogenázy. Následkem toho je zastavena produkce vodíku (Lloyd & Kristensen, 1985). Hydrogenosom je důležitý i z hlediska rezistence trichomonády k metronidazolu. K vývoji rezistence může

trichomonáda využít přítomnost kyslíku v prostředí, kdy kyslík buď reoxiduje vzniklý radikál metronidazolu a nebo kompetuje s metronidazolem o elektrony. Takzvaná aerobní rezistence je předstupněm vývoje úplné anaerobní rezistence, při které dochází k poklesu exprese některých důležitých hydrogenosomálních enzymů, jako je například PFO nebo hydrogenosomální jablečný enzym. Tyto enzymy za normálních okolností poskytují elektrony feredoxinu, který redukuje metronidazol. U vysoce rezistentních kmenů *T. vaginalis* k metronidazolu navíc nedochází k expresi ani feredoxinu, ani hydrogenázy (Quon *et al.*, 1992; Kulda, 1999).

V roce 2009 se však ukázalo, že k aktivaci metronidazolu možná nedochází pouze v hydrogenosomu, ale že by za aktivaci metronidazolu mohla být zodpovědná i cytosolická thioredoxin reduktáza (Leitsch *et al.*, 2009).



Obr. 2: Navržená mapa metabolismu hydrogenosomu *T. vaginalis* (Hrdý, 2007): Oranžové trojúhelníky představují enzymy, které jsou zapojené do energetického metabolismu. Žlutými ovály je znázorněn feredoxin, který poskytuje elektrony hydrogenázám, které následně produkují vodík. Růžově je znázorněn metronidazol, kterému feredoxin předává elektrony, které získal oxidativní dekarboxylací pyruvátu nebo malátu. To vede k reduktivní aktivaci metronidazolu. Předpokládané funkce proteinů jsou znázorněny následovně: růžově, skládání

železosirných klastrů a hydrogenázy; modře, detoxifikace kyslíku; žlutě, metabolismus aminokyselin; zeleně, translokace a maturace proteinů. Prázdná kolečka v membráně naznačují neidentifikované transportéry, které pravděpodobně zprostředkovávají transport substrátů a metabolitů. Zkratky: AK, adenylát kináza; Fdx, feredoxin; GDC, komplex glycin dekarboxylázy; Hy, hydrogenáza; PFO, pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza; SOD, superoxid dismutáza; STK, sukcinát thiokináza (sukcinát CoA ligáza, sukcinyl-CoA syntetáza); SHMT, serin hydroxymetyl transferáza; Trx, thioredoxin; TrxP, thioredoxin peroxidáza; TrxR, thioredoxin reduktáza; THF-CH₂, N⁵, N¹⁰-metylen tetrahydrofolát; ASCT, sukcinyl-CoA:acetát CoA transferáza; oxidase?, tuto reakci pravděpodobně katalyzuje „flavodiiron protein A“; HydG, HydF, HydE, maturázy Fe hydrogenázy; IscS, cystein desulfuráza; IscU, „FeS scaffold protein“; IscA a Nfu, alternativní „FeS scaffold protein“; Hsp 70, Hsp60, Hsp10, proteiny tepelného šoku („heat shock proteins“); Jac1 a Mdj1, J – doménu obsahující kochaperony; Mge, „nukleotide exchange factor“; HPP, hydrogenosomální procesující peptidáza; Hmp35, hydrogenosomální integrální membránový protein; Tom?, předpokládaná translokáza vnější membrány; Tim23?, základní translokáza vnitřní membrány; Sam50, základní složka „sorting and assembly machinery“; Pam18, „J-domain containing protein of the presequence translocase associated motor komplex“; MCF, „mitochondrial carrier family protein“ (Hmp31, ATP/ADP přenašeč). Přerušovaná čára představuje předpokládané reakce.

3.4 *Trichomonas vaginalis* a kyslík

Přestože *Trichomonas vaginalis* je tradičně označována za anaerobní organismus, ve skutečnosti prospívá lépe při velmi nízkých koncentracích kyslíku než za úplné anaerobiózy a je proto spíše mikroaerofilem. To je způsobeno pravděpodobně tím, že v přirozeném prostředí trichomonád, ve vagině, je fyziologická koncentrace kyslíku 15 – 56 μM (Wagner & Levin, 1978), a tudíž nízké koncentrace kyslíku (< 0,25 μM) růstu trichomonád spíše svědčí (Paget & Lloyd, 1990). S tím ale souvisí nutnost vypořádat se s reaktivními formami kyslíku (ROS), jako jsou superoxidové anionty ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$), které vznikají buď enzymaticky, nebo když přijde kyslík do styku s redukovanými flaviny nebo FeS centry proteinů. Tyto ROS poškozují různé buněčné struktury jako například enzymy, DNA, membránové lipidy a další. Proto mají buňky vyvinuté systémy obrany proti těmto ROS. Enzymy pomáhající redukovat ROS jsou například superoxid dismutáza (SOD, katalyzuje dismutaci superoxidových radikálů na kyslík a peroxid vodíku), kataláza (katalyzuje redukcí peroxidu vodíku na kyslík a vodu) a nebo

glutathion peroxidáza (katalyzuje redukci peroxidů na vodu na účet redukovaného glutathionu) (Halliwell, 1989). Ovšem *T. vaginalis* katalázu a glutathion postrádá. Předpokládá se, že funkci glutathionu plní převážně cystein a jiné thioly, jako například propanthiol, metanthiol nebo H₂S (Ellis *et al.*, 1994). Navíc má trichomonáda ještě další mechanismy a proteiny a enzymy, jak se vypořádat s ROS. Jsou jimi například NADH oxidáza, NADPH oxidáza, Fe – SOD, flavodiiron protein (FDP), rubrerytrin, peroxiredoxinový systém a další.

V cytoplasmě má *T. vaginalis* reduktázy kyslíku, NADH oxidázu, redukující kyslík na vodu, a NADPH oxidázu, redukující kyslík na peroxid vodíku (Thong & Coombs, 1987; Linstead & Bradley, 1988), a Fe-SOD (Ellis *et al.*, 1994). Pro detoxifikaci peroxidu vodíku používá trichomonáda další klíčový mechanismus detoxifikace ROS a tím je 2-Cys peroxiredoxinový systém, který redukuje peroxidy, hydroperoxidy a peroxonitrily na vodu. K tomu je zapotřebí tří enzymů - thioredoxin peroxidázy, thioredoxinu, thioredoxin reduktázy a zdroje redukčních ekvivalentů, kterým je v tomto případě NADPH. Thioredoxin peroxidáza je redukována thioredoxinem, a thioredoxin je redukovaný NADPH – dependentní thioredoxin reduktázou (McGonigle *et al.*, 1998). Peroxiredoxinový systém je přítomný jak v cytosolu, tak v hydrogenosomu (Pütz *et al.*, 2005).

Když je ale kyslíku více, než dokážou redukovat enzymy v cytoplasmě, difunduje do hydrogenosomu (Čerkasov *et al.*, 1978; Müller & Lindmark, 1978), kde plní roli terminálního akceptoru elektronů na úkor protonů, a trichomonáda přestává produkovat molekulární vodík (Lloyd & Kristensen, 1985).

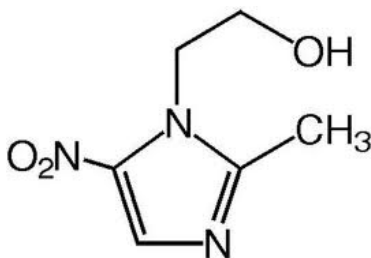
Protože hlavní hydrogenosomální enzymy, PFO a hydrogenáza, jsou vysoce citlivé na koncentraci kyslíku a ROS, má proti nim trichomonáda vyvinuté i další hydrogenosomální obranné mechanismy. Jedním z nich je například hydrogenosomální Fe – SOD, která stejně jako Fe – SOD v cytosolu dismutuje superoxidový radikál na peroxid vodíku (Ellis *et al.*, 1994). Vzhledem k tomu, že trichomonáda nemá katalázu, která by redukovala peroxid vodíku dále na vodu, předpokládá se, že by tuto funkci mohl vykonávat peroxiredoxinový systém a rubrerytrin, které byly u *T. vaginalis* nalezeny v rámci genomového projektu (Pütz *et al.*, 2005).

Dalším hydrogenosomálním proteinem, který se účastní detoxifikace kyslíku je „flavodiiron“ protein (FDP), redukující kyslík na vodu. FDP je redukovaný feredoxinem, který bere elektrony od PFO. Alternativní dráha redukce kyslíku na vodu pomocí FDP vede přes komplex 1, který si bere elektrony od NADH, a feredoxin (Smutná *et al.*, 2009).

Dále byly u *T. vaginalis* v rámci genomového projektu objeveny i geny pro železosírné (FeS) flavoproteiny (Carlton *et al.*, 2007). Všechny paralogy na 5' konci kódují typické krátké sekvence podobné adresovým sekvencím známých hydrogenosomálních proteinů, takže se předpokládá, že proteinové produkty jsou lokalizovány v hydrogenosomech (což bylo následně prokázáno proteomickými studiemi (Schneider *et al.*, 2011)). Jejich homolog byl charakterizován u archebakterie *Methanosarcina thermophila*, kde tento protein redukuje kyslík a peroxid vodíku na vodu, a elektrony pro tuto redukci získává od feredoxinu (Cruz & Ferry, 2006). Funkce těchto proteinů u trichomonád zatím není známa, ale předpokládá se, že budou hrát roli též v redukci kyslíku a dalších ROS. Tím by mohly pomáhat trichomonádě vypořádat se s oxidativním stresem.

3.5 *Trichomonas vaginalis* a metronidazol

Metronidazol (obr. 3) je nejčastěji používaný lék ze skupiny 5-nitroimidazolů, který se od roku 1960 používá na léčbu trichomoniázy. Sám o sobě je metronidazol netoxický. Vstupuje do buňky pasivní difuzí a v hydrogenosomu trichomonády slouží díky svému nízkému redoxpotenciálu (-415 mV) jako přednostní elektronový akceptor elektronů od feredoxinu (obr. 4). Vytváří se cytotoxický jednoelektronový radikál, který následně poškozuje buněčné struktury (Edwards, 1993; Kulda, 1999).



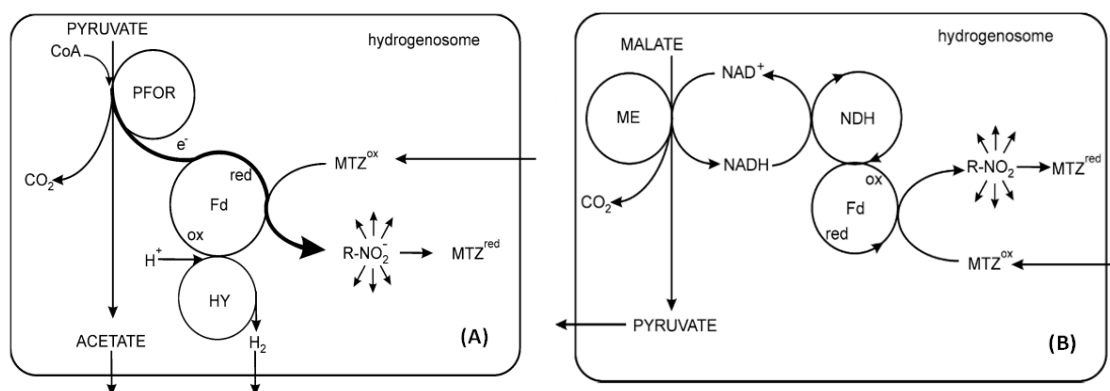
Obr. 3: Strukturální vzorec metronidazolu.

Rezistence k metronidazolu byla poprvé popsána dva roky poté, co se začal používat, ale celkově je výskyt rezistence k metronidazolu relativně nízký (Edwards, 1993). Popisují se dva druhy rezistence: aerobní a anaerobní, podle podmínek, za kterých vznikají. Aerobní rezistence se manifestuje pouze v přítomnosti kyslíku (Meingassner *et al.*, 1978). Předpokládá se, že v tomto případě kyslík buď reoxiduje radikál metronidazolu (tzv. futile cycling – jalový cyklus) a nebo že kyslík kompetuje s metronidazolem o elektrony od feredoxinu. Aerobní

rezistence je též předstupněm vývoje rezistence anaerobní. Ta je výsledkem eliminace metabolických drah hydrogenosomu aktivujících metronidazol. K tomu dochází tak, že hydrogenosom ztrácí některé své enzymatické aktivity, jako například aktivitu PFO a hydrogenosomálního jablečného enzymu (Kulda, 1999). Také aktivita hydrogenázy (Kulda, 1999) a exprese feredoxinu (Yarlett *et al.*, 1986) se snižují s vývojem rezistence.

V roce 2009 David Leitsch (Leitsch *et al.*, 2009) publikoval článek, ve kterém tvrdí, že k aktivaci metronidazolu dochází v cytoplasmě pomocí thioredoxin reduktázy, ale i neenzymaticky dvojmocným železem, volnými thioley a flaviny.

Dosavadní poznatky a také nové hypotézy o mechanismech aktivace metronidazolu a získání rezistence k němu naznačují, že je tato problematika velmi komplexní. V současné době nemůžeme vyloučit aktivaci metronidazolu v cytoplasmě a také není vyloučeno, že k jeho aktivaci dochází v obou kompartmentech. Taktéž je možné, že za rezistencí trichomonád k metronidazolu stojí ještě další dosud nepopsané faktory.



Obr. 4: Schéma aktivace metronidazolu v hydrogenosomu *T. vaginalis* přes metabolismus pyruvátu (A) nebo malátu (B) (Kulda, 2007). (A) V přítomnosti metronidazolu jsou elektrony produkované pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázou (PFOR) transportovány feredoxinem (Fd) na oxidovanou formu metronidazolu (MTZ^{ox}) a ne na jejich přirozený akceptor hydrogenázu (HY). Cytotoxické volné radikály R-NO₂⁻ jsou produkované jako intermediáty během redukce metronidazolu (MTZ^{red}). (B) Druhé schéma popisuje alternativní způsob aktivace metronidazolu v hydrogenosomu, kdy elektrony produkované hydrogenosomálním jablečným enzymem (ME) redukují NAD⁺ na NADH a NADH dehydrogenáza (NDH) recykluje NADH a přenáší elektrony na feredoxin (Fd), který je nakonec donorem elektronů pro redukci metronidazolu.

3.6 *Methanosarcina thermophila*, železosírné flavoproteiny a oxidativní stres

Methanosarcina thermophila je mírně termofilní metanogenní acetotrof. Její teplotní optimum je kolem 50 °C a pH optimum mezi hodnotami 6,0 a 7,0 (Zinder *et al.*, 1985). *Methanosarcina* je metabolicky velmi všestranná archebakterie, která dokáže metabolizovat acetát, metanol nebo metylované aminy jako substráty pro produkci metanu a CO₂ (Clements *et al.*, 1994).

Prvním krokem metabolismu acetátu je jeho aktivace na acetyl – CoA acetát kinázou a fosfotransacetylázou. Následuje štěpení C-C a C-S vazeb acetyl – CoA a oxidace jeho karbonylové skupiny na CO₂ a to jedním z hlavních enzymů karbohydrátového metabolismu, komplexem CO – dehydrogenázy – acetyl – CoA syntázy (CODH – ACS). Z této reakce přebírá od CODH – ACS elektrony feredoxin, který dále redukuje metylovou skupinu na metan (Clements & Ferry, 1992; Latimer *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998).

Předpokládá se, že důležitou roli v přenosu elektronů u archebakterií a anaerobních bakterií budou hrát železosírné flavoproteiny (ISF), které se vyskytují nejen u mnoha zástupců těchto skupin organismů, ale byly nalezeny již i u anaerobních eukaryot. Navíc většina druhů organismů, kde se tyto proteiny vyskytují, obsahuje více než jeden homolog těchto proteinů. To svědčí nejen o jejich důležité roli v přenosu elektronů, ale předpokládá se také, že by různé homology ISF mohly mít různou funkci (Zhao *et al.*, 2001).

U archebakterie *Methanosarcina thermophila* byl nalezen jeden železosírný flavoprotein. Strukturou je to homodimer, který obsahuje ve svém aktivním centru jeden flavin mononukleotid (FMN) a jedno [4Fe4S] centrum na monomer. Železosírné centrum je vázané na protein přes cysteiny, které v aminokyselinové sekvenci tvoří typický motiv CX₂CX₂CX₅C (Zhao *et al.*, 2001).

V případě, že *Methanosarcina* metabolizuje CO místo karbonylové skupiny acetyl – CoA, je CO oxidován feredoxinem, feredoxin dále redukuje ISF. Výzkumy ukázaly, že ISF následně redukuje kyslík, eventuelně peroxid vodíku na vodu a tím pomáhá methanosarcině vypořádat se s oxidativním stresem. Předpokládá se, že [4Fe4S] klastr zprostředkovává přenos elektronů od feredoxinu na FMN a ten následně redukuje kyslík nebo peroxid vodíku (Cruz & Ferry, 2006). Pro tento fakt svědčí i redoxní potenciály [4Fe4S] klastru (-395 mV) a FMN (-277 mV) (Zhao *et al.*, 2001).

3.7 *Trichomonas vaginalis* a železosírné flavoproteiny

Jak již bylo zmíněno, železosírné flavoproteiny se vyskytují napříč celým spektrem anaerobních organismů a například u archebakterie *Methanosarcina thermophila* redukuje ISF kyslík a peroxid vodíku na vodu. *Trichomonas vaginalis* je doposud jedním ze dvou eukaryot, kde byl ISF nalezen. Tím druhým je střevní parazit *Entamoeba histolytica*. Entamoeba má ovšem jen jeden ISF, zatímco u trichomonády bylo nalezeno sedm homologních genů tohoto proteinu (Carlton *et al.*, 2007) a tři z nich byly nalezeny v proteomu hydrogenosomu (Schneider *et al.*, 2011). V hydrogenosomu se nalézají taktéž feredoxiny, donory elektronů pro ISF u methanosarciny. Tudíž předpokládáme, že i zde, u trichomonády, budou feredoxiny plnit funkci donoru elektronů pro redukci ISF.

My jsme si na základě předběžných pokusů, zaměřených na zjištění míry transkripce jednotlivých paralogů, vybrali pro charakterizaci funkce této skupiny proteinů u trichomonády jednoho zástupce ISF – ISF3 (TVAG_154730) (obr. 5).

MLASASRFATNVLIFNASPRAYGNTYKLLLEQVKKGVESKKGKTAELVQ
LSQLKFDG C I A C L E C K L K G K E S K P G C V V Q D D F T Q Y I D R I K D V D A F V L G
SPVYWSNLSSLYYKAYEKIMYSFHNYDNDKPYKMTRPIKTGLIFSGGA
PKDYFDNGYKAMCKQQSDILKFIFKGHSEYMTMPSQLLLPDTSRLHIP
SERIEEKKTFNEAHLEELKQNAFEMGVRLASE

Obr. 5: Aminokyselinová sekvence ISF3. ■ – hydrogenosomální signální sekvence; ■ – cysteiny vázající [4Fe4S] klastr.

4 Cíle diplomové práce

V rámci této diplomové práce, kterou jsem zpracovávala na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy na katedře parazitologie, jsem měla za úkol charakterizovat železosírné flavoproteiny (ISF) z hydrogenosomu parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*.

Jediný charakterizovaný homolog tohoto proteinu z anaerobní archebakterie *Methanosarcina thermophila* redukuje kyslík a peroxid vodíku na vodu a tím tyto pro anaerobní organismus toxické látky detoxifikuje. Pro tuto redukci využívá elektrony přijímané od feredoxinu, což je hlavní elektrontransportní protein v hydrogenosomech *Trichomonas vaginalis*. Tudíž nás zajímalo, zda železosírné flavoproteiny *T. vaginalis* mají stejnou funkci jako u archebakterie.

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Prokázat expresi a určit lokalizaci ISF v buňce *T. vaginalis*.
2. Zaklonovat a overexprimovat rekombinantní ISF v *E. coli*.
3. Charakterizovat fyzikální a chemické vlastnosti ISF.
4. Pomocí biochemických metod zjistit aktivity enzymu.

5 Materiál a metody

5.1 Zásobní roztoky a pufry

5.1.1 Kultivace

Antibiotika:

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

Diamondovo médium TYM na kultivaci *T. vaginalis*:

trypton (OXOID)	10 g
kvasničný autolyzát (Imuna Pharm)	5 g
maltóza (Sigma)	5 g
L-cystein (Sigma)	1 g
kyselina askorbová (Sigma)	0,2 g
KH ₂ PO ₄ (Fluka)	0,8 g
K ₂ HPO ₄ (Fluka)	0,8 g
destilovaná voda	do 900 ml
citrát železnato amonný.....	1 ml
agar	0,5 g

Upravit pH pomocí KOH na 6,2. Sterilizovat v autoklávu (120°C, 20 minut) a po sterilizaci přidat 100 ml inaktivovaného koňského séra (10% výsledná koncentrace) (inaktivace séra při 56°C po dobu 30 minut).

LB médium (kultivace *E. coli*):

LB médium (Sigma)	20 g / 1l
destilovaná voda	do 1000 ml
agar – pouze na agarové plotny	6 g

SOC medium:

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

Navázat trypton, autolyzát, NaCl a KCl, pH upravit na hodnotu 7, doplnit do 100 ml a vyautoklávovat. Po vychladnutí přidat glukózu a MgCl₂, rozplnit a uchovávat v -20 °C.

X-Gal

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galaktosid)	100 mg
N,N'-dimetyl-formamid	2 ml

Uchovávat obalené v alobalu v -20 °C. Na LB plotnu nanášet 20 μl.

5.1.2 2D elektroforéza**Rehydratační pufr:**

močovina (Sigma)	7 M
thiomočovina (Sigma)	2 M
CHAPS (Sigma)	4%
DTT	100 mM
20% Triton	500 μl
bromfenolová modř	zrnko

Nejprve rozpustím močovinu s thiomočovinou, CHAPS a DTT a nakonec přidám bromfenolovou modř.

Ekvilibrační pufr:

močovina	6 M
TRIS	50 mM
SDS	2%
DTT	65 mM
glycerol	20%

Nejprve rozpustím močovinu, přidám TRIS a upravím pH na hodnotu 8,8 pomocí HCl, přidám glycerol, DTT a SDS a po úplném rozpuštění přidám zrnko bromfenolové modře a doplním do požadovaného objemu.

5.1.3 Barvení gelu stříbřením

Roztok A:

99% etanol	50 ml
kyselina octová	12 ml
dH ₂ O	38 ml
37% formaldehyd	50 µl

Trvanlivost 1 měsíc při laboratorní teplotě.

Roztok B:

etanol	50%
--------------	-----

Roztok C:

Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	10 mg
--	-------

Doplnit do 100 ml dH₂O.

Roztok D:

AgNO ₃	100 mg
-------------------------	--------

Doplnit do 100 ml dH₂O. Roztok připravovat vždy čerstvý.

Roztok E:

Na ₂ CO ₃	3 g
37% formaldehyd	50 µl
roztok C	2 ml
dH ₂ O	98 ml

Trvanlivost roztoku je 1 měsíc při laboratorní teplotě.

Roztok F:

EDTA	25 mM
------------	-------

5.1.4 Western blotová analýza**Blokovací roztok na Western blot:**

nízkotučné sušené mléko (Laktino)	1 - 10%
Tween ® 20 (Sigma)	0,25 - 0,5%
PBS	

PBS:

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

Roztok barvy Ponceau S:

Ponceau S (Fluka)	0,5%
ledová kyselina octová	1%

Substrát pro alkalickou fosfatázu

tablety Sigma Fast BCIP / NBT

5.1.5 Protilátky

Primární protilátky:

Anti-HaHa monoklonální protilátka (myš IgG) (Exbio)
Anti-5xHis monoklonální protilátka (myš IgG) (QiaGen)
Anti-ISF3 polyklonální protilátka (králík) (Eurogentec)
Anti-ME polyklonální protilátka (králík) (Eurogentec)

Sekundární protilátky:

Imunofluorescence

Protilátka proti myšímu IgG, ALEXA FLUOR 488 (Molecular Probes)
Protilátka proti králičímu IgG ALEXA FLUOR 594 (Molecular Probes)

Western blotová analýza

Protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL)
Protilátka proti myšímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ICN/CAPPEL)

5.1.6 Imunofluorescence

Blokovací roztok na imunofluorescenci:

PBS	100 ml
BSA	0,25%
FISH želatina (Sigma)	0,25%
TWEEN® 20 (Sigma)	0,05%

5.1.7 Izolace proteinů

Pufry pro izolaci rekombinantního ISF-His nativně:

Lyzační pufr (pH 8,5):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
imidazol	10 mM
glycerol	20%
destilovaná voda	

Promývací pufr (pH 8,5):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
imidazol	40 mM
glycerol	20%
destilovaná voda	

Eluční pufr (pH 8,5):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
imidazol	250 mM
glycerol	20%
destilovaná voda	

Pufry pro izolaci PFO:

Pufr A:

KH ₂ PO ₄	10 mM
---------------------------------------	-------

Upravit pH na hodnotu 6,8 pomocí KOH.

Pufr B:

KH ₂ PO ₄	10 mM
---------------------------------------	-------

Upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí KOH.

Pufr C:

KH ₂ PO ₄	10 mM
---------------------------------------	-------

octan sodný	1 M
-------------	-----

Upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí KOH.

Zásobní roztoky:

flavin mononukleotid (FMN) (Sigma)	100 mM
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ .6H ₂ O	200 mM
IPTG, dioxane free (Fermentas)	0,1 M
DNAsa I (Promega)	1000 U/ml
leupeptin	5 mg/ml
RNAsa A (Fermentas)	10 mg/ml
Tosyl-lysine-chloromethylketon (TLCK)	25 mg/ml

5.1.8 Izolace hydrogenosomů

ST pufr

sacharóza	250 mM
TRIS (Sigma).....	10 mM
KCl	0,5 mM

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

5.1.9 Biochemie

Koenzym A (CoA) ~8,68mM:

CoA (Sigma)	16 mg
glutathion (Sigma)	192 mg
0,1M fosfátový pufr, pH 6,8	2 ml

Hodinu inkubovat při laboratorní teplotě, pak přidat 0,4 ml 0,5 M EDTA, pH 6,8.

metylviolegen (N, N'-dimetyl-4,4'bipiridinium, MV)

(Sigma)	400 mM
---------------	--------

5.2 Použité organismy

5.2.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis, kmen T1 (TvT1) (poskytnutý J. H. Taiem, Institute of Biomedical Science, Taipei, Taiwan) jsem používala při transformaci plasmidem nesoucím ISF pro ověření hydrogenosomální lokalizace proteinu.

Trichomonas vaginalis, kmen TV 10-02 jsem použila na qRT-PCR a na Western blotovou analýzu a imunodetekci ISF v buněčných frakcích.

Trichomonas vaginalis, kmen TV 10-02 MR100 (vysoce k metronidazolu rezistentní laboratorní kmen trichomonád) jsem použila na qRT-PCR a na Western blotovou analýzu a imunodetekci ISF.

Buňky jsem udržovala v axenické kultuře v Diamondově médiu TYM, pH 6,2 při 37°C s agarem nebo bez agaru. Kulturu jsem očkovala do čerstvého média každých 24 až 48 hodin.

5.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli XL1 Blue (Invitrogen) a TOP 10 jsem použila pro transformaci pGEM T-easy vektorem s vloženým genem pro ISF3 bez hydrogenosomální signální sekvence, značeným na N-konci His tagem.

Escherichia coli BL21 (DE3) (Invitrogen) jsem použila pro expresi rekombinantního ISF3 (bez hydrogenosomální signální sekvence, s His tagem) v expresním plasmidu pET-42b.

5.3 Použité geny a proteiny

Železosírný flavoprotein 1: ISF1; TVAG_040030 (použitý pro qRT-PCR)

Železosírný flavoprotein 2: ISF2; TVAG_146730 (použitý pro qRT-PCR)

Železosírný flavoprotein 3: ISF3; TVAG_154730 (použitý pro qRT-PCR, izolovaný protein použitý pro overexpresi v *E. coli*, biochemické studie, přípravu polyklonálních protilátek)

Železosírný flavoprotein 4: ISF4; TVAG_167200 (použitý pro qRT-PCR)

Železosírný flavoprotein 5: ISF5; TVAG_327760 (použitý pro qRT-PCR)

Železosírný flavoprotein 6: ISF6; TVAG_370510 (použitý pro qRT-PCR)

Železosírný flavoprotein 7: ISF7; TVAG_444140 (použitý pro qRT-PCR)

Feredoxin 1 (TvFdx); TVAG_003900 (izolovaný protein použitý pro spektrofotometrické měření aktivit ISF)

Pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza (směs PFO A a B1); TVAG_198110 a TVAG_230580 (izolovaný protein použitý pro spektrofotometrické měření aktivit ISF)

β – tubulin; TVAG_073810 (použitý na qRT-PCR)

5.4 Použité primery

Geny byly amplifikovány pomocí následujících primerů s uvedenými restrikčními místy:

Primery pro expresi ISF3 ve vektoru pET-42b

forward; *VspI* 5' – ATT ▼ AAT ATG GCA ACA AAT GTA CTT ATT – 3'
reverse; +HIS; *BamHI* 5' – GGA ▼ TCC TTC GGA AGC AAG TCT GAC – 3'

Primery pro expresi ISF3 v *T. vaginalis*, vektor TagVag HaHa

forward; *VspI* 5' – ATT ▼ AAT ATG CTT GCA TCC GCC AGC – 3'
reverse; +HIS; *BamHI* 5' – GGA ▼ TCC TTC GGA AGC AAG TCT GAC – 3'

Primery pro qRT-PCR

Gen *isf1*

forward 5' – CAG AAG TAT CTT GAC CAA CT – 3'
reverse 5' – TCG AAG AAG GAG TAG AAG TA – 3'

Gen *isf2*

forward 5' – CAT ATC AAG GAC TAC ATG GA – 3'
reverse 5' – CTT GTG TGC AGT TAG TAA CA – 3'

Gen *isf3*

forward 5' – AGA CAG GAC TTA TCT TCT CA – 3'
reverse 5' – CAT GGT CAT GTA CTC AGA AT – 3'

Gen *isf4*

forward 5' – TCT CTT CAA TGC CAG TTC TA – 3'
reverse 5' – CTG ATT CAA CAC CTT CCT TA – 3'

Gen *isf5*

forward 5' – AAG TTA TGG ATT CCA AGT GA – 3'
reverse 5' – TTA AGA CAC CTT CCT GAT GT – 3'

Gen *isf6*

forward 5' – GCT TAC ATC TAT TCC ATC TA – 3'
reverse 5' – GCT TAA CTG TGT TGT TGT TA – 3'

Gen *isf7*

forward 5' – CTT CTC ATC CAA CTT CTA CA – 3'
reverse 5' – ACA AGG CCA GTC TTA ATA GT – 3'

Program PCR pro kontrolu cDNA (cycler MJ Research PTC – 200 Peltier Thermal Cycler; Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystem):

1. 94 °C 5 min.
2. 94 °C 30 s
3. 59 °C 30 s
4. 72 °C 30 s
5. 35x opakovat krok 2 – 4
6. 72 °C 7 min.
7. 15 °C napořád

5.5.2 Analýza vzorků DNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu

Vzorky DNA (po PCR nebo po restričním štěpení) jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarózovém gelu s přidavkem SYBR Safe (Invitrogen). Vzorek jsem nejprve smíchala s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrem (Fermentas) a poté nanasla na gel. Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 90V. Jako standard pro porovnání velikosti DNA fragmentu jsem použila Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (1μg/μl, Fermentas). DNA jsem vizualizovala pomocí UV transluminátoru.

5.5.3 Ligace do pGEM® - T easy vektoru

pGEM® - T easy vektor (Invitrogen) je TOPO vektor používaný pro AT klonování PCR produktu z genomové DNA. Ligační reakce o celkovém objemu 10μl obsahovala:

2x ligační pufr T4-DNA	5μl
T4 DNA ligáza	1μl
pGEM-T easy vektor	1μl
PCR produkt	3μl

Ligační reakci jsem nechala přes noc inkubovat při 4 °C v lednici.

5.5.4 Transformace *E. coli*

Bakterie *E. coli* jsem transformovala tepelným šokem 30 sekund při 42°C a nechala stát 2 minuty na ledu. Poté jsem přidala 250 μl SOC média (předehřátého na 37°C) a buňky inkubovala na třepačce při 37°C 1 hodinu. Následně jsem bakterie vysela na Petriho misky

s tuhým LB médiem a přidaným ampicilinem a 25 μ l X-Galu a nebo kanamycinem. Takto vyseté buňky jsem inkubovala v termostatu při 37°C přes noc.

5.5.5 DNA Miniprep

Vektor se zaligovaným genem jsem z buněk *E. coli* izolovala pomocí kitu Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) a následně štěpila specifickými restriktázami.

5.5.6 Štěpení vektoru

Vektor s daným genem jsem štěpila specifickými restriktázami v reakci o celkovém objemu 10 μ l:

restriktáza 1	0,5 μ l
restriktáza 2	0,5 μ l
restrikční pufr	1 μ l
miniprep	8 μ l

Směs jsem zamíchala, stočila a nechala přes noc v termostatu při 37 °C. Vzorek jsem analyzovala pomocí horizontální elektroforézy na 1% agaróze.

5.5.7 Extrakce DNA z agarózového gelu

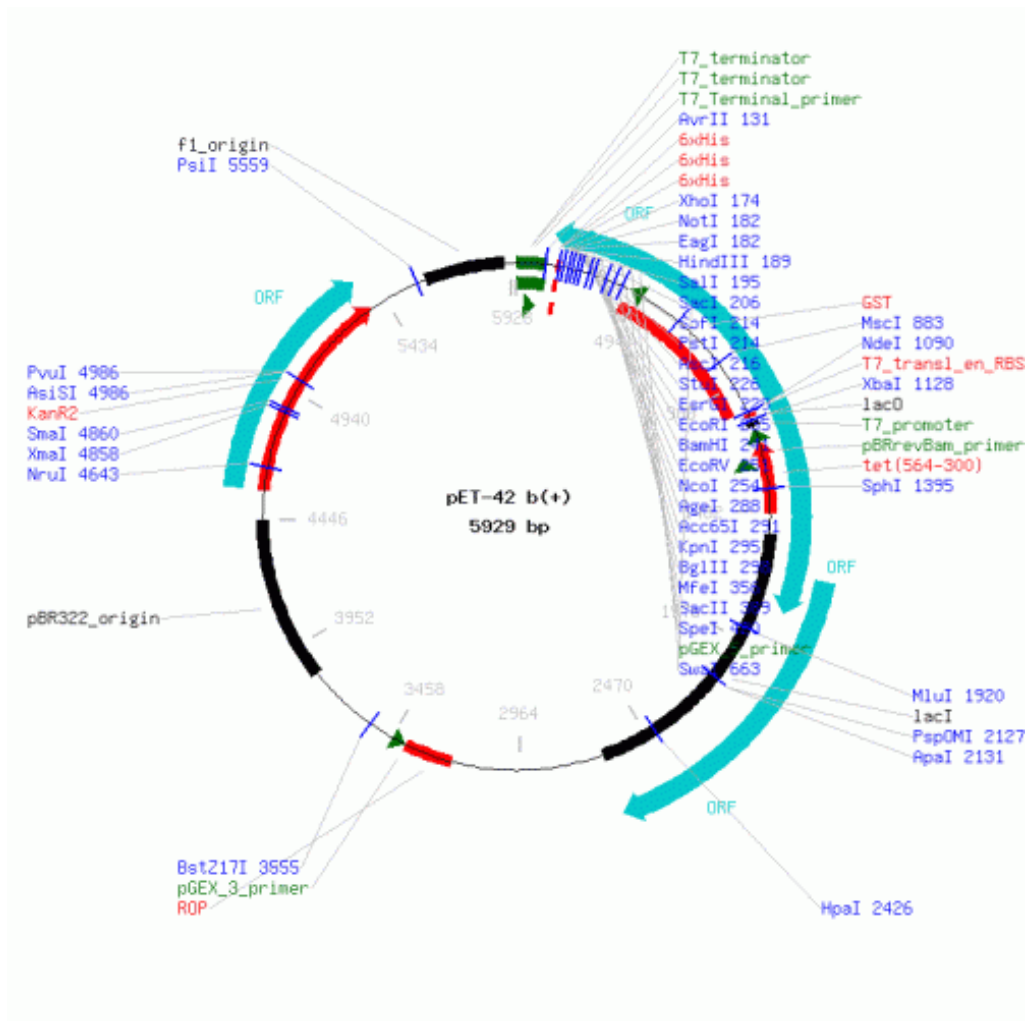
Po vyhodnocení elektroforézy jsem vzorek o požadované velikosti vyřízla z gelu sterilním skalpelem a DNA jsem z gelu izolovala za použití QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen).

5.5.8 Ligace do expresního vektoru pET-42b

Vektor pET-42b je expresní vektor, jehož mapa je na obrázku číslo 6. Ligační reakce o celkovém objemu 10 μ l obsahovala:

2x ligační pufr T4-DNA	1 μ l
T4 DNA ligáza	1 μ l
směs vektoru a DNA	8 μ l

Směs jsem inkubovala přes noc při 13 °C. Následně jsem touto směsí transformovala expresní buňky *E. coli* BL21 (DE3) podle návodu popsaného výše.



Obr. 6: Mapa expresního vektoru pET-42b+ (<http://www.lablife.org>).

5.5.9 SDS proteinová elektroforéza

Proteiny byly separovány podle jejich molekulové hmotnosti standardní vertikální elektroforézou v 12% polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Před nanesením vzorku na elektroforézu (Mini Protean II, BioRad) jsem vzorky smíchala s 1 x SDS-PAGE vzorkovým pufrům a denaturovala ve vodní lázni při 100°C 5 minut. Pro určení relativní molekulové hmotnosti byl použit standard Dalton Mark VII-L (Sigma) (66, 45, 36, 29, 24, 20 a 14,2 kDa) nebo standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa). Po elektroforéze byly proteiny vizualizovány obarvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB).

5.5.10 Barvení gelu stříbřením

Roztoky pro barvení gelu stříbrem jsou popsány v kapitole 5.1.3. Gel po SDS proteinové elektroforéze jsem fixovala 1 hodinu v roztoku A při laboratorní teplotě. Následně jsem gel 3 x 20 minut promyla v roztoku B a poté 1 minutu v roztoku C. Následovalo promytí 3 x 20 sekund v dH₂O. Pak jsem gel 20 minut inkubovala v roztoku D a poté 3 x 20 sekund promývala v dH₂O. Gel jsem vyvolala inkubováním v roztoku E cca 30 minut. Vyvolání jsem zastavila roztokem F, ve kterém jsem gel inkubovala 20 min. Nakonec jsem gel promyla 10 minut v dH₂O.

5.5.11 Western blotová analýza

Blotovala jsem při proudu 1,5 mA / cm² membrány po dobu 1 hodiny a 15 minut. Po přeblotování gelu na membránu jsem membránu obarvila roztokem Ponceau S a poté promyla destilovanou vodou. Vodou promytou membránu lze skladovat při 4°C. Pro Western blotovou analýzu jsem použila polosuchý blot (Biometra) a zdroj Bio-Rad.

5.5.12 2D elektroforéza

Pro 2D elektroforézu jsem použila 7 cm strip (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare), pH 3 – 11 / 11 cm strip (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare), pH 3 – 11. Do rehydratačního vzorku jsem přidala 50 – 100 µg proteinu / 100 – 200 µg proteinu (11 cm strip), 0,2 % amfilitu (IPG pufr, pH 3-11 NL, GE Healthcare) a vzorek jsem doplnila do 125 µl / 200 µl rehydratačním pufrém. Vzorek jsem zvortexovala a nechala stát 15 minut při laboratorní teplotě. Celý vzorek jsem následně nanasla do jamky stripovací destičky podél celé její délky a opatrně jsem do jamky vložila strip gelem dolů tak, aby všechen vzorek zůstal pod stripem. Takto připravený strip jsem nechala stát 30 minut při laboratorní teplotě, zalila jsem ho 1 ml minerálního oleje a nechala stát při laboratorní teplotě přes noc. Druhý den jsem strip přenesla na filtrační papír gelem nahoru, osušila jsem ho od oleje a vložila do destičky s elektrodami (na elektrody dát čtverečky filtračního papíru a zakápnout 8 µl dH₂O) gelem dolů tak, aby gel ležel na obou elektrodách, a gel jsem zalila 1 ml minerálního oleje. Destičku jsem přikryla víčkem. Vždy se musí rozlišovat + a – na gelu i na elektrodách a ve fokusátoru (Protean IEF Cell, Bio-Rad). Pro fokusaci jsem zvolila program:

500 V	1 hod.
1 000 V	1 hod.
2 000 V	2 hod.
4 000 V	8 – 9 tis. VH

Po skončení programu jsem stripy opět osušila od minerálního oleje a gelem nahoru jsem je vložila do stripovací destičky. Takto se stripy mohou skladovat v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (následně nechat rozmrazit 30 minut), nebo lze ihned pokračovat druhým rozměrem (vertikální SDS-PAGE elektroforéza). Stripy se musí nejdříve před elektroforézou 3 x promýt destilovanou vodou. Poté se přidá 1 ml ekvilibračního roztoku a 2 x 15 minut se stripy promyjí na kývačce. Následně se strip vloží do jamky v gelu (+ musí být u standardu), strip musí v jamce ležet. Dále se pokračuje jako při 1D SDS proteinové elektroforéze.

5.5.13 Imunodetekce proteinu na nitrocelulóзовé membráně

Nitrocelulóзовou membránu s přebloťovaným vzorkem jsem inkubovala minimálně 1 hodinu při laboratorní teplotě, většinou však přes noc v lednici, v blokovacím pufru. Poté jsem membránu inkubovala 1 hodinu v blokovacím pufru s primární protilátkou při laboratorní teplotě (protilátky jsou popsány v kapitole 5.1.5). Dále jsem membránu promyla 3 x 15 minut v blokovacím pufru a opět inkubovala 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou v blokovacím pufru. Následně jsem membránu opět promyla 2 x 15 minut v blokovacím pufru a 1 x v PBS. Takto promytou membránu jsem inkubovala se substrátem pro alkalickou fosfatázu (tableta Sigma Fast BCIP / NBT) (barevná reakce).

5.5.14 DNA Midiprep

K izolaci dostatečného množství rekombinantních plasmidů pro transformaci do buněk *T. vaginalis* byl použit kit Wizard® Plus Midipreps (Promega).

Koncentraci DNA jsem změřila na nanodropu (NanoDrop ND – 1000 Spectrophotometer).

5.5.15 Elektroporace trichomonád

Sterilně jsem zcentrifugovala 1 l trichomonád kmene TvT1 při 1000 x g / 15 min. / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po celou dobu jsem pracovala na ledu. Pelet jsem zvažila a na každý gram jsem přidala 0,5 ml média TYM 6,2 bez agaru s přidáním amikacinem (250 U/ml) a penicilinem (1000 U/ml). Suspenzi trichomonád jsem 4 x resuspendovala přes G 23 jehlu. Do 4mm kyvety (4 MM Gene pulser Cuvette, Biorad) jsem napipetovala 300 μl buněk a přidala 50 μg DNA

(plasmidu) o maximálním objemu 50 μ l. Trichomonády jsem elektroporovala při časové konstantě 175 ms a napětí 350 V nebo při kapacitanci 975 μ F a napětí 350 V (elektroporátor GenePulser Xcell, Bio-Rad). Poté jsem buňky ihned resuspendovala do vytemperovaného média TYM 6,2 bez agaru s přidaným amikacinem a penicilinem a po 4 hodinách kultivace při 37 °C jsem přidala geneticin o výsledné koncentraci 200 μ g/ml. Druhý den, když byla kultura dobře narostlá, jsem médium stočila při 1000 x g / 15 min. / 4 °C a pelet resuspendovala do čerstvého média s antibiotiky (geneticin 100 μ g/ml, amikacin 250 U/ml, penicilin 1000 U/ml). Kulturu jsem následně udržovala v médiu TYM 6,2 s agarem nebo bez agaru a pro selekci pozitivních transformantů jsem použila geneticin o výsledné koncentraci 200 μ g/ml.

5.5.16 Imunofluorescence

Příprava podložních skel

Očištěná podložní skla jsem inkubovala 20 minut v 1 M HCl a poté jsem skla promyla mírným proudem tekoucí vody po dobu 30 minut. Skla se následně opláchnou 2 x 5 minut v destilované vodě a inkubují 30 minut v acetonu, osuší se a ponoří do 2% roztoku 3-aminopropyltriethoxylanu (Sigma) v acetonu na 30 minut. Dalších 30 minut se promývají proudem tekoucí vody, opláchnou se 2 x 5 minut v destilované vodě a zapečou se při 100 °C po dobu 60 minut.

Příprava preparátů

Narostlou kulturu elektroporovaných trichomonád jsem nechala přilnout na připravená podložní skla v inkubační komůrce při 37 °C po dobu 15 minut. Přilnuté buňky na podložním skle jsem nechala lehce oschnout a poté jsem je fixovala ve vychlazeném metanolu (-20 °C) po dobu 5 minut a permeabilizovala 5 minut ve vychlazeném acetonu (-20 °C). Preparáty jsem nechala oschnout a poté jsem je blokovala v blokovacím pufru 1 hodinu ve vlhké komůrce. Následovala inkubace s primární myší monoklonální protilátkou v blokovacím pufru proti hemagglutininovému značení na C-konci rekombinantních proteinů (protilátku ředit 1:1000) a inkubace s primární králičí protilátkou proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu (ředit 1:1000) 1 hodinu ve vlhké komůrce. Preparáty jsem poté 3 x 5 minut promyla v PBS a následně inkubovala se sekundární protilátkou značenou ALEXA FLUOR 488 v blokovacím roztoku proti myší monoklonální protilátce společně se sekundární protilátkou značenou ALEXA FLUOR 594 proti králičí primární protilátce 1 hodinu ve vlhké komůrce.

Protilátky jsem ředila 1:1000. Preparáty jsem opět 3 x 5 minut promyla v PBS. Poté jsem preparáty zalila médiem Vecta-shield s DAPI (Vector laboratories) pro značení jaderné DNA.

5.5.17 Nativní izolace rekombinantního proteinu ISF3

Kultivace bakterií na izolaci rekombinantního proteinu

Buňky (*E. coli* BL21 (DE3)) jsem přes noc napěstovala v 50 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml) při 37 °C (na třepačce). Druhý den jsem objem 50 ml převedla do 1,5 l LB média s kanamycinem (50 µg/ml) a nadále pěstovala na třepačce při 37 °C a po dosažení potřebné optické denzity ($OD_{600}=0,6-0,8$) jsem bakterie indukovala IPTG (200 µM), přidala jsem FMN (250 µM) a $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (400µM), snížila jsem teplotu na 16 °C a nechala jsem bakterie při této teplotě přes noc.

Izolace proteinu

Napěstované bakterie jsem stočila na centrifuze (Beckman Avanti J-26 XPI) při 6000 x g / 15 min. / 4 °C. Pelet jsem resuspendovala v cca 25 ml lyzačního pufru, přidala jsem lysozym (cca 4 – 5 mg / 20 ml suspenze), DNAsu (1,5 – 2 mg / 20 ml suspenze), 40 µl leupeptinu (1 µl/ml) a 40 µl TLCK (1 µl/ml) a nechala jsem bakterie stát 30 minut na ledu. Poté jsem bakterie homogenizovala na FRENCH® PRESSURE CELL DISRUPTER (Thermo elektron corporation; cell pressure 124 000 kPa). Vzniklý lyzát jsem centrifugovala při 245 000 x g / 45 min. / 4 °C (Beckman OptimaTH L – 90K, rotor Ti 50.2). Ze supernatantu Ivan Hrdý izoloval protein na kapalinovém chromatografu (BioLogic Duo Flow, Bio-Rad) pomocí stupňovitého gradientu (25 / 50 / 100 / 250 mM v 50 ml) imidazolu (obr. 11). Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS proteinové elektroforézy.

5.5.18 Izolace hydrogenosomů

Příprava buněk

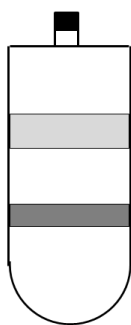
Buňky *T. vaginalis* jsem stočila na centrifuze při 2 000 x g / 15 min. / 4 °C. Supernatant jsem odstranila odsátím vývěvou. Pelet jsem resuspendovala ve fyziologickém roztoku a opět jsem buňky stočila, supernatant odsála. To celé jsem ještě jednou zopakovala a pelet jsem resuspendovala v 50 ml ST pufru, převedla do 50 ml centrifugační zkumavky a opět stočila při 1 000 x g / 5 min. / 4 °C a odsála supernatant. Buňky jsem opět resuspendovala v 20 ml ST pufru a přidala jsem inhibitory proteáz na finální koncentraci 10 µg/ml leupeptinu a 50 µg/ml TLCK a probublala 5 minut dusíkem. Buňky jsem následně homogenizovala

2 – 3 x sonikátorem Vibra Cell při amplitudě 40 – 50 a 1s pulsy po dobu jedné minuty do té doby, než byly skoro všechny buňky rozbité. Po každém intervalu jsem buňky promíchala a zkontrolovala pod mikroskopem. Homogenát jsem stočila při 600 x g / 10 min. / 4 °C (sediment obsahuje nerozbité buňky a jádra) a supernatant jsem dále stočila na ultracentrifuze při 23 000 x g / 30 min. / 4 °C. Pelet obsahuje LGF (Large Granular Fraction) obohacenou buněčnými organelami, lysozomy a hydrogenosomy. Supernatant obsahuje cytoplasmu. Pelet jsem 2 x promyla v 1 ml ST pufru a stočila při 10 000 x g / 10 min. / 4 °C a opatrně jsem odsála bílé lysozomy z okraje hnědého peletu hydrogenosomů. Pelet jsem resuspendovala v 250 µl ST pufru, do kterého jsem přidala leupeptin (10 µg/ml) a TLCK (50 µg/ml). Cytoplasmu, homogenát i hydrogenosomy jsem držela po celou dobu izolace na ledu. Dlouhodobě se skladují v –70 °C.

Pakliže chceme získat čistší hydrogenosomální frakci, použijeme isopykknickou centrifugaci na gradientu Percollu. Naplníme čtyři 36,2ml Opti Seal (Beckman) centrifugační zkumavky pro VTi – 50 rotor do ultracentrifugy (Beckman OptimaTH L – 90K) 45% roztokem Percollu:

2 x ST pufr	18 ml
Percoll	16,2 ml
dH ₂ O	1,8 ml
TLCK	72 µl
leupeptin	72 µl

Centrifugační zkumavky se několikrát převrátí, aby se roztoky dobře promíchaly, 3 ml roztoku Percollu se odstraní ze zkumavky, přidá se suspenze LGF a zkumavka se doplní roztokem Percollu. Vzorek se stočí na ultracentrifuze (Beckman OptimaTM L – 90K) v rotoru VTi – 50 při 67 000 x g / 30 min. / 4 °C s použitím pomalé brzdy. Hydrogenosomy se nacházejí v nižší, tmavší frakci, lysozomy jsou méně denzní a světlejší frakce (obr. 7). Hydrogenosomy přeneseme pipetou do zkumavky a naředíme přibližně 10 x ST pufr, promyjeme a stočíme na ultracentrifuze v rotoru Ti - 50.2 při 23 000 x g / 10 min. / 4 °C. Přidáme inhibitory proteáz a skladujeme při –70 °C.



Obr. 7: Distribuce hydrogenosomů (nižší, tmavší frakce) a lyzozomů (horní, světlejší frakce) po gradientové centrifugaci na 45% gradientu Percollu.

5.5.19 Izolace rekombinantního feredoxinu TvFdx

Feredoxin 1 (*T. vaginalis*) purifikovala Tamara Smutná metodou popsanou M. S. Vidakovičem (Vidakovič *et al.*, 1996, Šuťák *et al.*, 2004).

Feredoxin byl purifikován z bakterií *E. coli* BL 21 transformovaných plasmidem pET-3a obsahujícím gen pro feredoxin 1. Do LB média na kultivaci bakterií byl přidán kanamycin (100 µg/ml) a chloramfenikol (30 µg/ml). Buňky byly pěstovány na třepačce při 37 °C. Po dosažení OD₆₀₀ 0,6 – 0,8 byla kultura indukována přidáním IPTG (0,2 mM) a 3 ml 100 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ a inkubována 6 hodin při 37 °C. Přes noc se bakterie nechaly stát v chladové místnosti při 4 °C. Následující den byly bakterie sklizeny, promyty ve fyziologickém roztoku a homogenizovány. Homogenát byl stočen na centrifuze a bakteriální cytoplasma obsahující rekombinantní feredoxin byla pročištěna dvěma kroky při kapalinové chromatografii za použití BioLogic Duo Flow systému (Bio-Rad). Prvním krokem je pročištění aniontovou výměnnou chromatografií na koloně s DEAE-Sephacem (kolona XK 16, GE Healthcare) s gradientem NaCl (0 – 1 M NaCl) a rychlostí průtoku 2 ml/min. Hnědočervené frakce obsahující feredoxin byly zakoncentrovány na ultrafiltru Milipore Amicon Ultra při 4000 x g / 15 min. / 4 °C. Feredoxin byl dále purifikován isokratickou elucí na Superose 12 (kolona K26, GE Healthcare) s rychlostí průtoku 2 ml/min. Frakce s feredoxinem byly opět zahuštěny a skladovány při –70 °C.

5.5.20 Izolace PFO z buněk *T. vaginalis*

Nejprve jsem pufry (popsané v kapitole 5.1.7) odvzdušnila probubláním dusíkem a následně evakuací vývěvou. K pufru A jsem přidala 400 µl oktylgukosidu

(n-OCTYL-beta-glukopyranosid 50%, ICN Biomedicals), 300 μ l hydrogenosomů promytých s inhibitory proteáz a suspenzi jsem doplnila pufrem A do 10 ml. Směs jsem homogenizovala v Dounceově homogenizátoru a inkubovala 30 minut na ledu, občas jsem směs promíchala (nezpěnit). Po inkubaci jsem suspenzi stočila při 200 000 x g / 20 min. / 4 °C. Supernatant mohu skladovat v -70 °C, obsahuje komplex 1 (dvě katalytické subjednotky homologní s mitochondriálním komplexem 1). Do pufru B jsem přidala DTT (2 mM finální koncentrace) a thiosiřičitan sodný (0,25 mM finální koncentrace) a pufr jsem probublala dusíkem. Z takto upraveného pufru B jsem připravila 10 ml pufru s 1% deoxycholátem a resuspendovala jsem v něm pelet a opět homogenizovala a inkubovala v Dounceově homogenizátoru na ledu. Po 30 minutách inkubace jsem směs opět stočila při 200 000 x g / 20 min. / 4 °C. Odebrala jsem vzorek na SDS – PAGE analýzu. Nachystala jsem kolonu s Ni-NTA – agarózou, promyla jsem ji pufrem B s DTT a thiosiřičitanem (bez deoxycholátu), supernatant jsem nanasla na Ni-NTA – agarózu a pročištěný vzorek jsem sbírala. PFO má skoro stejnou nativní molekulovou hmotnost jako hydrogenosomální jablečný enzym (cca 240 kDa), ten se ale váže na Ni-NTA – agarózu, PFO však proteče. Nakonec jsem kolonu ještě promyla 1 ml pufru B s deoxycholátem. Odebrala jsem vzorek na SDS – PAGE analýzu. Eluát z Ni-NTA agarózové kolony obsahující PFO byl zahuštěn ultrafiltrací na objem 500 μ l a nanesen na kolonu s náplní Superdexu 200 (kolona 10 / 300 GL, GE Healthcare) ekvilibrovanou pufrem o složení 2 mM DTT, 0,25 mM dithioničitan sodný, 0,5% deoxycholát sodný, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,4, průtokem 0,5 ml/min. Proteinové složení frakcí obsahujících maximum aktivity PFO bylo ověřeno SDS-PAGE. Aktivitu PFO z frakcí s nejvyšším množstvím enzymu jsem ověřila spektrofotometricky a aktivní purifikovanou rekombinantní PFO jsem použila jako zdroj enzymatické aktivity oxidativně dekarboxylující pyruvát a poskytující tak elektrony pro redukci ISF.

5.5.21 Stanovení proteinů ve vzorcích

Proteiny jsem stanovovala metodou popsanou Lowrym (Lowry *et al.*, 1951) za použití BSA jako proteinového standardu (1 mg/ml roztok).

5.5.22 Stanovení nativní molekulové hmotnosti ISF

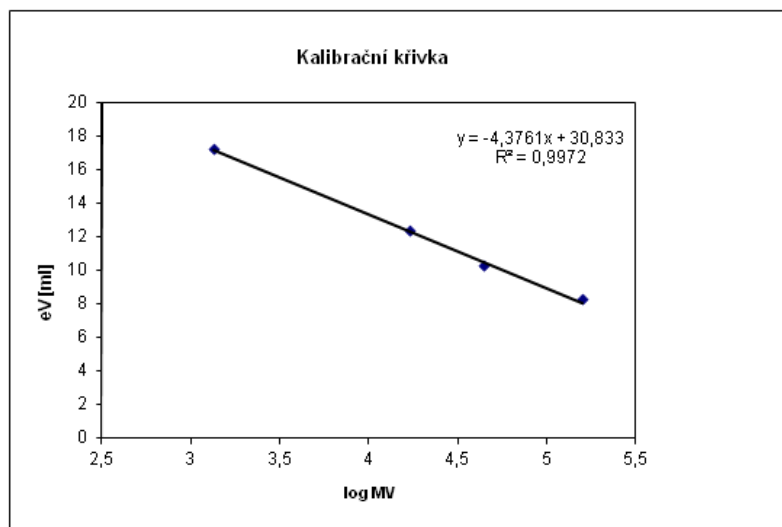
Nativní molekulová hmotnost ISF3 byla analyzována gelovou filtrační chromatografií na aparatuře BioLogic Duo Flow (Bio-Rad). Kolona se Superdexem 75 (kolona 10 / 300 GL,

GE Healthcare) byla promyta pufrům s 250 mM imidazolem, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl a 20% glycerolem, pH 8,5.

Rekombinantní ISF3 (0,5 ml, cca 2 mg) byl nanesen na kolonu s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Nativní molekulová hmotnost proteinu se vypočítala z kalibrační křivky s použitými standardy 158 kDa, 44 kDa, 17 kDa a 1,35 kDa za stejných podmínek (tab. 1, obr. 8).

Tab. 1: Molekulární hmotnost a eluční objemy proteinových standardů, použitých na kalibrační křivku

Relativní molekulová hmotnost (MW)	Eluční objem [ml]
158 000	8,26
44 000	10,22
17 000	12,39
1 350	17,18



Obr. 8: Kalibrační křivka kolony se Superdexem 75 se standardy molekulové hmotnosti (158, 44, 17 a 13,5 kDa). Rovnice kalibrační křivky byla použita na výpočet nativní molekulové hmotnosti ISF3.

5.5.23 Charakterizace kofaktoru ISF

Expresní bakterie *E. coli* BL21 (DE3) pro charakterizaci jsem napěstovala bez přidání FMN. Jako eluční pufr při izolaci jsem použila pufr bez glycerolu. Izolovaný protein jsem zahustila

na cca 250 μl na Milipore Amicon ultrafiltru při 4500 x g / 15 min / 4 °C. Zahuštěný protein jsem resuspendovala do 2 ml dH_2O a opět zahustila. Takto přepufrovaný protein jsem denaturovala 5 minut při 100 °C. Vysrážený protein jsem stočila při 13 000 x g / 15 min. / 4 °C, odebrala jsem supernatant a ten jsem zlyofilizovala. Zlyofilizovaný vzorek jsem rozpustila v cca 100 - 150 μl dH_2O . 50 μl vzorku jsem nanesla na TLC desku (HPTLC hliníková fólie Silicagel 60, 20 x 20 cm, bez fluorescenčního indikátoru) spolu se standardy FMN (0,6 mM, 50 μl) a FAD (0,6 mM, 50 μl). Mobilní fázi jsem připravila ze směsi n-butanolu, kyseliny octové a vody v poměru 6 : 2 : 4. Vzorky jsem detekovala UV světlem a retenční faktor (R_f) jsem vypočítala podle vzorce:

$$R_f = V_M / V_R,$$

kde V_M je vzdálenost středu skvrny od startu a V_R je vzdálenost čela solventu od startu.

5.5.24 Charakterizace železosírného centra

Složení železosírného centra bylo dopočítáno díky stanovení koncentrace železa v proteinu.

5.5.25 Stanovení koncentrace železa v proteinu

Obsah železa jsem stanovovala spektrofotometricky při 593 nm pomocí 2, 4, 6-tri (2-pyridyl) -S- triazinu metodou popsanou v publikaci D. S. Fischera (Fischer & Price, 1964).

5.5.26 Ověření aktivity pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO)

Aktivitu PFO jsem ověřovala ve speciálních anaerobních kyvetách se dvěma raménky. Reakční směs v kyvetě obsahovala 2 ml 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,4), 2,5 mM metylviologen (50 μl 100 mM MV), 1% merkptoetanol (20 μl merkptoetanolu), 7 mM roztok pyruvátu (20 μl 0,7 M roztoku) a 0,22 mM roztok CoA (50 μl 8,7 mM roztoku). Do jednoho raménka byl odměřen přesný objem měřeného proteinového vzorku s 10% roztokem Tritonu X – 100 v poměru 1:1. Kyveta byla 10 minut probublávána dusíkem. Aktivita PFO byla měřena po smíchání proteinového vzorku s reakční směsí při vlnové délce 600 nm. Změna absorbance byla odečtena z křivky průběhu reakce.

5.5.27 Stanovení aktivity ISF3

Aktivitu ISF3 jsem měřila spektrofotometricky. Nejprve jsem se pokoušela ISF3 redukovat. Toho lze docílit dvojitým způsobem, nefyziologicky a s použitím fyziologických donorů elektronů. Při prvních pokusech jsem použila jako donor elektronů dithioničitan sodný a postupnou titrací jsem ISF3 redukovala. Následně jsme testovali fyziologické donory elektronů. Podle výzkumů ISF u archebakterie *Methanosarcina thermophila* by jí měl být feredoxin. Proto jsme se pokusili ISF3 zredukovat feredoxinem v systému s PFO. PFO získává elektrony z oxidace pyruvátu a předává je na feredoxin. Jako akceptory elektronů od ISF3 jsme zkusili například kyslík, peroxid vodíku, dusičnan sodný nebo metronidazol.

Do anaerobní kyvety, ve které jsem měřila spektrum ISF3, jsem dala 800 μ l pufru bez imidazolu a 200 μ l proteinu. Takto připravený vzorek jsem probublala 10 minut dusíkem. Redukci proteinu jsem prováděla postupným přidáváním dithioničitanu sodného. Pro redukci ISF3 v přirozeném systému jsem smíchala 1 ml pufru bez imidazolu s 25 μ l CoA, 5 μ l merkaptoetanolu a 10 μ l pyruvátu v anaerobní kyvetě. Směs jsem probublala 10 minut dusíkem a přidala jsem 200 μ l proteinu, 20 μ l PFO a do celé směsi jsem postupně přidávala feredoxin. Zredukováný protein jsem zkoušela oxidovat přidáváním různých potencionálních akceptorů.

5.5.28 qRT-PCR

Izolace RNA

Celková RNA byla z buněk *T. vaginalis* izolována TRIZOLEm (Total RNA Isolation Reagent, Gibco BRL). Buňky pro izolaci RNA jsem napěstovala v 10ml zkumavkách a sterilně jsem je stočila při 1000 x g / 15 min. / 4 °C. Pelet jsem převedla do sterilní 1,5ml zkumavky a resuspendovala v 1 ml TRIZOLu a směs jsem inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě. Do reakce jsem přidala 200 μ l chloroformu a směs jsem vortexovala a inkubovala 3 minuty při laboratorní teplotě. Následně jsem směs centrifugovala při 11 500 x g / 15 min. / 4 °C. Při centrifugaci se oddělí spodní červená fáze (DNA a proteiny), interfáze a vrchní bezbarvá vodní fáze (RNA). Vrchní bezbarvou fází jsem převedla do sterilní 1,5ml zkumavky, přidala jsem 0,5 ml izopropanolu, promíchala a nechala 10 minut stát při laboratorní teplotě. Poté jsem směs opět centrifugovala při 11 500 x g / 15 min. / 4 °C. RNA precipitát vytvořil pelet na dně. Supernatant jsem opatrně odsála a pelet promyla 1 ml 75% etanolu. Vortexováním jsem pelet rozmíchala a centrifugovala při 7 500 x g / 5 min. / 4 °C. Opatrně jsme odsála etanol a pelet sušila na vzduchu asi 30 minut a následně jsem ho rozpustila v 30 – 50 μ l

destilované vody s DEPC. Při rozpouštění jsem RNA inkubovala 10 minut při 55 °C. Po rozpouštění RNA jsem odebrala kontrolní vzorek pro PCR. Vzorek RNA je ovšem znečištěný DNA, kterou je nutné odstranit. To jsem provedla pomocí RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit (50) (Quiagen). V 1,5ml zkumavce jsem smíchala (na celkové množství 10 µl):

celkové množství RNA v 10µl reakci	1 µg
10x reakční pufr + MgCl ₂	1 µl
DNase (RNase-free, 1 U / µl, Fermentas)	1 µl
dH ₂ O s DEPC	do 10 µl

Směs jsem inkubovala 1 hodinu při 37 °C. Poté jsem přidala 1 µl 25 mM EDTA a inkubovala 10 minut při 65 °C. Čistotu RNA jsem ověřila pomocí PCR (po PCR nesmí být na elektroforéze u čisté RNA žádný signál).

Přepis RNA do cDNA

cDNA byla připravena reverzní transkripcí vyizolované RNA pomocí SuperScript™ Reverse Transcriptase III (Invitrogen). Vyizolovanou RNA jsem smíchala s 1 µl Oligo (dT) primerem (Promega) a s 1 µl 10 mM dNTP. Směs jsem inkubovala 5 minut při 65 °C, poté jsem ji zchladila na ledu a krátce stočila na centrifuze. Dále jsem přidala 4 µl 5x FS pufru, 2 µl 0,1 M DTT a 1 µl SUPERase – In (Ambion). Směs jsem mírně promíchala a inkubovala 2 minuty při 42 °C. Poté jsem přidala 1 µl Superscriptu III a opět inkubovala 50 minut při 42 °C a následně ještě 15 minut při 70 °C. Po skončení inkubace jsem odebrala kontrolní vzorek pro PCR.

qRT-PCR

10µl reakce:

dH ₂ O	3,8 µl
iQ™ SYBR ® Green Supermix (Bio-Rad)	5 µl
forward primer	0,4 µl
reverse primer	0,4 µl
cDNA	0,4 µl

Program qRT-PCR (Roche cycler LC480):

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

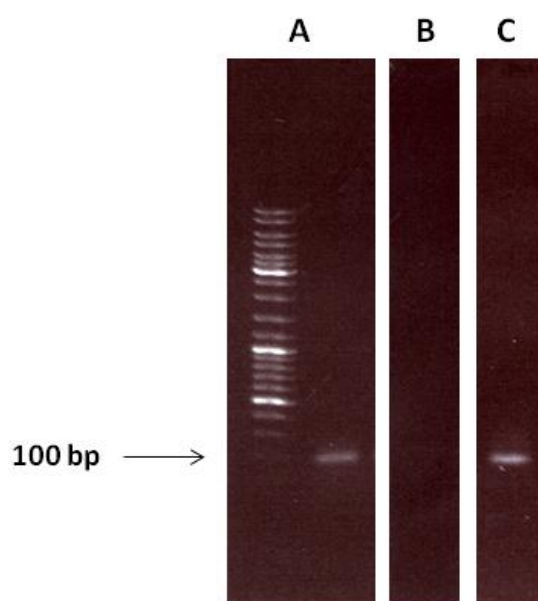
Vyhodnocení výsledků jsem prováděla v programu Microsoft Excel a relativní míru transkripce jsem počítala z hodnot C_T .

6 Výsledky

6.1 qRT-PCR

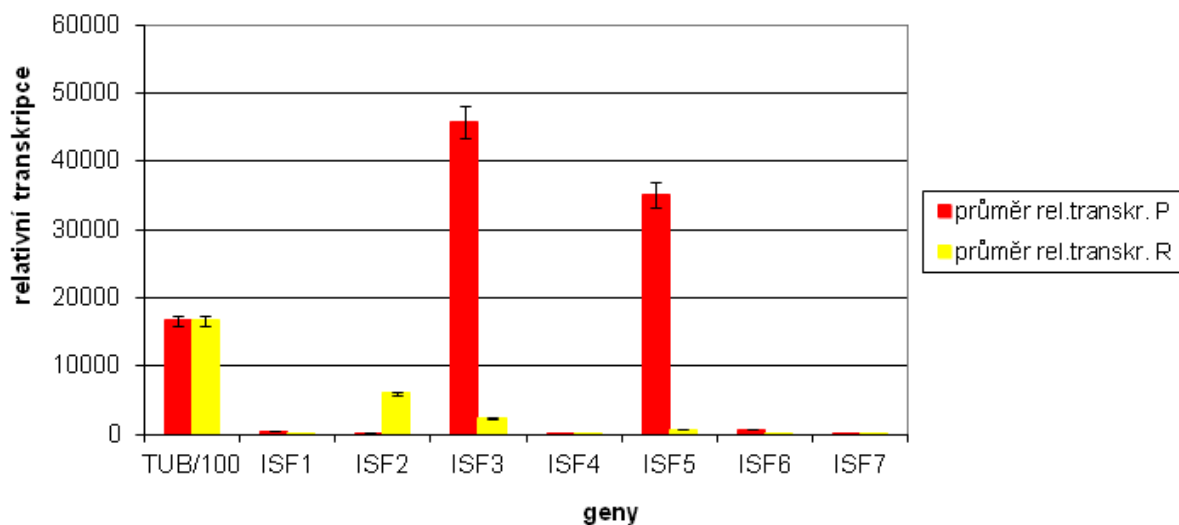
Cílem kvantitativní RT-PCR bylo zjistit, jestli se mění exprese ISF v závislosti na tom, zda jsou trichomonády citlivé nebo rezistentní k metronidazolu. Zároveň jsme chtěli pomocí qRT-PCR určit dominantně transkribovaný gen, jehož proteinový produkt bychom dále podrobněji charakterizovali.

Celkovou RNA trichomonád jsem izolovala TRIZOLEm a následně přepsala do cDNA pomocí SuperScript™ Reverse Transcriptase. Jednotlivé kroky izolace RNA a přepisu RNA do cDNA jsem kontrolovala pomocí PCR (obr. 9). Relativní koncentrace železosirných flavoproteinů jsem vypočítala z hodnot C_T (obr. 10). Tyto výsledky korespondují s daty publikovanými Schneiderem a kol. (Schneider *et al.*, 2011). Jejich výsledky ukazují, že se v proteomu hydrogenosomu nacházejí tři ze sedmi železosirných flavoproteinů anotovaných v genomu *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007), jsou jimi ISF1, ISF3 a ISF5.



Obr. 9: Kontrolní PCR v průběhu izolace RNA a jejího přepisu do cDNA. A, izolovaná RNA, kontaminovaná DNA; B, RNA po inkubaci s DNasou, DNA byla ze vzorku odstraněna; C, cDNA. Použité primery: gen pro β – tubulin; TVAG_073810.

Relativní transkripce železosirných flavoproteinů *T. vaginalis*

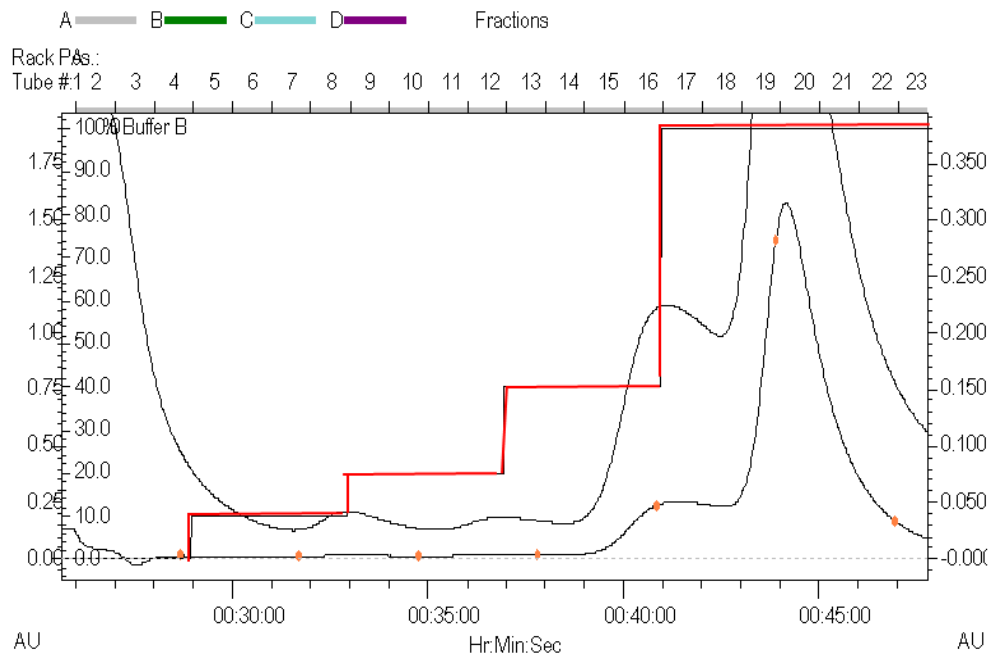


Obr. 10: Výsledky z qRT-PCR. Červené sloupce znázorňují průměrné hodnoty relativní transkripce FeS flavoproteinů u wild-type kmene *T. vaginalis* (P). Žluté sloupce znázorňují průměrné hodnoty relativní transkripce kmene *T. vaginalis* vysoce rezistentního k metronidazolu (R). TUB je referenční gen tubulinu.

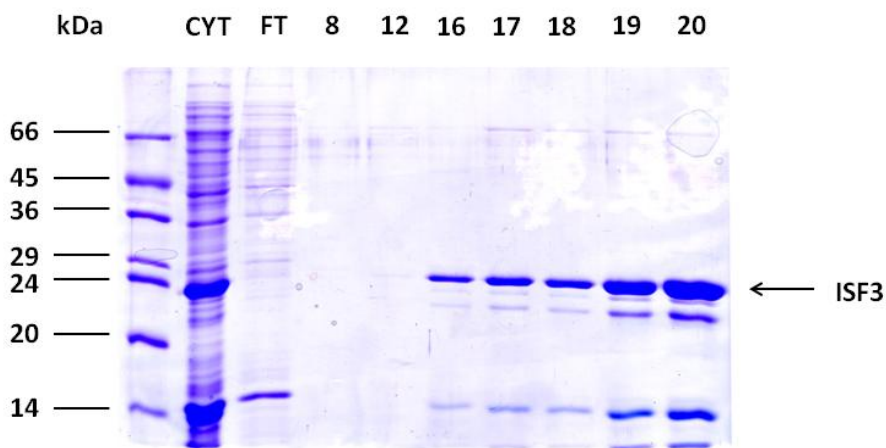
6.2 Izolace ISF3

Rekombinantní ISF3 byl exprimován v buňkách *E. coli* BL21 (DE3), transformovaných plasmidem pET – 42b. Overexprimovaný ISF3 byl bez hydrogenosomální signální sekvence a na C-konci byl značen His – tagem.

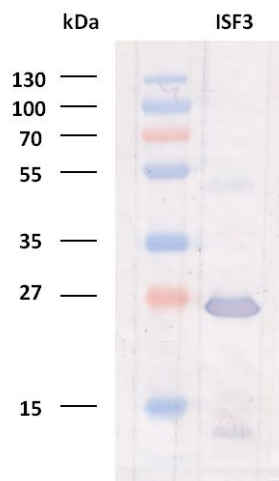
Nativní protein byl izolován afinitní chromatografií na koloně s Ni – NTA agarózou pomocí stupňovitého gradientu (25 / 50 / 100 / 250 mM) imidazolu (obr. 11). Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS proteinové elektroforézy (obr. 12) a identita proteinu byla ověřena také pomocí Western blotové analýzy. Na Western blotovou analýzu jsem použila primární protilátku Anti-His (myš, 1:1000) a sekundární protilátku proti myšimu IgG, konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000) (obr. 13). Absorpční spektrum rekombinantního ISF3 s His–tagem je na obr. 14, jsou zde vidět absorpční maxima při 490, 460, 435 a 385 nm. Celkový průběh spektra odpovídá hodnotám zjištěným pro železosirný flavoprotein z *Methanosarcina thermophila* (Latimer *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001).



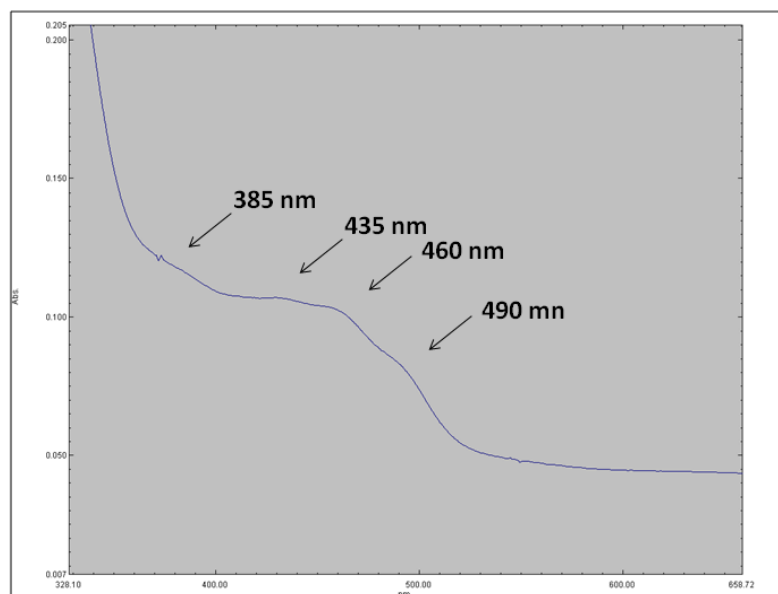
Obr. 11: Purifikace rekombinantního ISF3-His afinitní chromatografií na koloně s Ni – NTA agarózou pomocí stupňovitého gradientu imidazolu. 16 – 21, frakce s ISF3; AU, absorbance; křivka s oranžovými značkami, absorpce ISF3 při 450 nm; červená čára, gradient imidazolu (25 / 50 / 100 / 250 mM imidazol); černá křivka, eluce ISF3 měřená při 280 nm.



Obr. 12: SDS proteinová elektroforéza (12% gel) izolace ISF3 afinitní chromatografií. kDa, standard molekulových hmotností; CYT, cytoplasma *E. coli* exprimujících ISF3; FT, cytoplasma po tom, co protekla kolonou; 8, 12, 16 – 20, jednotlivé frakce izolace ISF3.



Obr. 13: Reprezentativní Western blotová analýza ISF3-His (26,5 kDa) izolovaného afinitní chromatografií na koloně s Ni-NTA agarózou. Detekce anti-His protilátkou, vizualizace alkalickou fosfatázou.



Obr. 14: UV-VIS absorpční spektrum rekombinantního ISF3-His s absorpčními maximy při 490, 460, 435 a 385 nm.

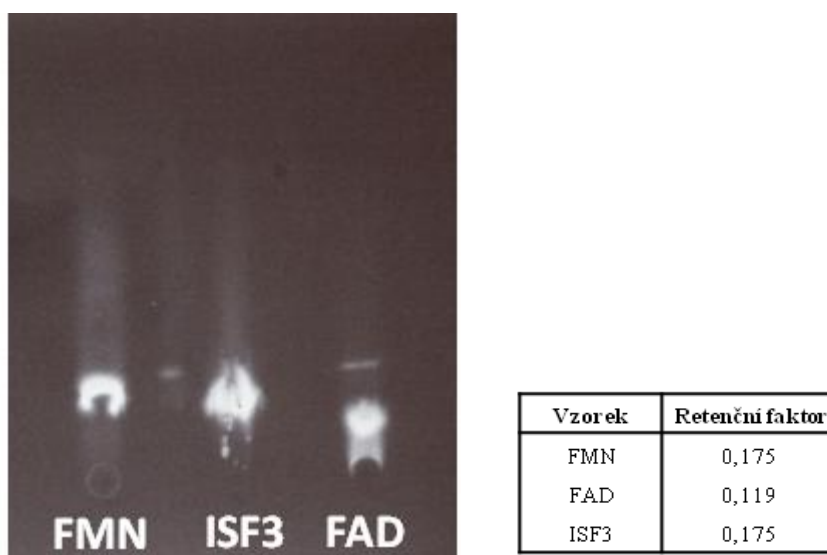
6.3 Stanovení molekulové hmotnosti ISF3

Molekulová hmotnost monoméru ISF3, stanovená redukující SDS elektroforézou, je přibližně 26,5 kDa. U archebakterie *M. thermophila* je aktivní ISF homodimer. Pomocí SDS elektroforézy byla hmotnost ISF methanosarciny odhadnuta na 29 kDa a hmotnost nativního proteinu gelovou filtrační chromatografií na 65 kDa (Latimer *et al.*, 1996).

Pro determinaci nativní molekulové hmotnosti ISF3 *T. vaginalis* jsem použila rekombinantní protein značený His – tagem. Molekulovou hmotnost jsme stanovovali gelovou filtrační chromatografií na aparatuře BioLogic Duo Flow (Bio-Rad) a koloně se Superdexem 75 (kolona 10/300 GL, GE Healthcare). Molekulová hmotnost ISF3 byla vypočítána z kalibrační křivky (obr. 8) a je přibližně 51,6 kDa – nativní ISF3 je tedy dimer, což koresponduje s výsledky stanovení molekulové hmotnosti ISF u *M. thermophila*.

6.4 Charakterizace kofaktoru

ISF3 byl exprimován v bakteriích *E. coli* BL21 (DE3) kultivovaných v médiu bez přídavku flavinů. Kofaktor vázaný v ISF3 jsem stanovovala tenkovrstevnou chromatografií (TLC) (obr. 15). Jako standardy jsem použila roztoky FMN (0,6 mM, 50 μ l) a FAD (0,6 mM, 50 μ l). Abych získala kofaktor vázaný v ISF3, musela jsem protein nejprve denaturovat. Uvolněný kofaktor jsem zahustila lyofilizací a následně rozpustila v cca 100 – 150 μ l destilované vody, z toho jsem 50 μ l nanesla na TLC desku. Jako mobilní fázi jsem použila směs n-butanolu, vody a kyseliny octové. Výsledek jsem vizualizovala UV světlem. Retenční faktor kofaktoru z ISF3 jsem porovnávala s retenčními faktory standardů. Z výsledků je patrné, že ISF3 váže jako kofaktor FMN.

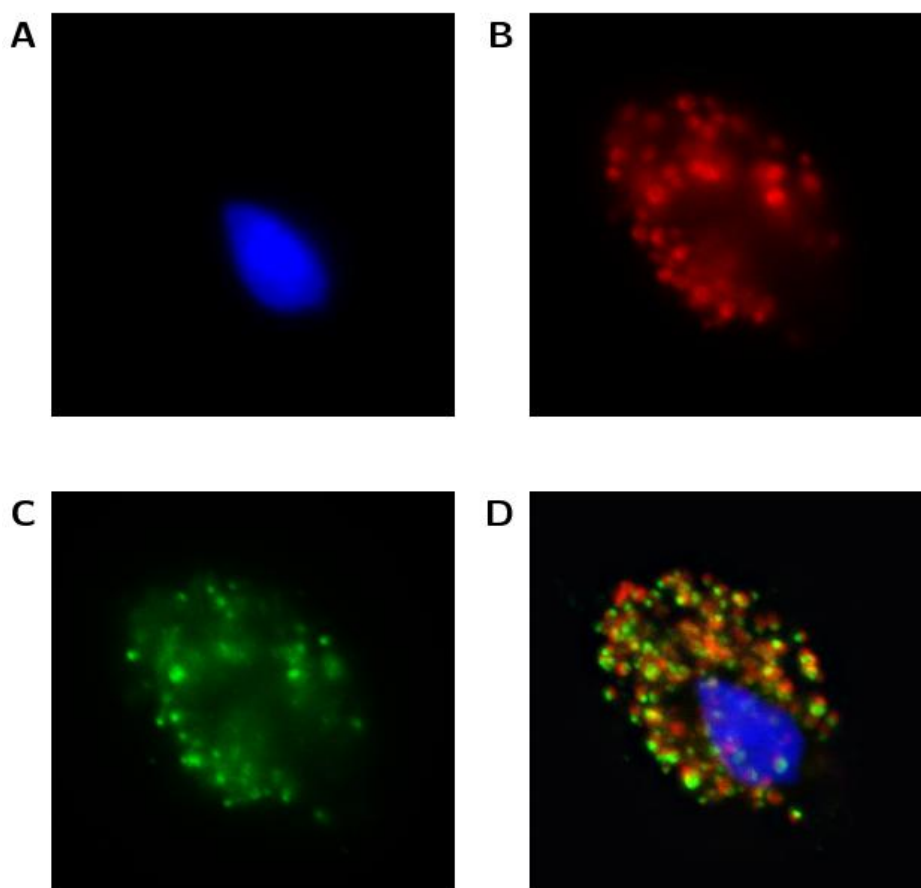


Obr. 15: Identifikace flavinového kofaktoru ISF3 pomocí TLC, vizualizace UV světlem. FMN, roztok FMN; FAD, roztok FAD; ISF3, kofaktor uvolněný z rekombinantního ISF3.

6.5 Lokalizace ISF3 v buňkách *T. vaginalis*

6.5.1 Lokalizace nepřímou fluorescencí

Pro lokalizaci ISF3 v trichomonádách jsem napěstovala 1 l buněčné kultury, kterou jsem zpracovala podle postupu, popsaného v kapitole 5.5.15. Takto přichystané buňky *T. vaginalis* jsem transformovala plasmidem TagVag s vloženým genem pro ISF3 s hydrogenosomální signální sekvencí zfúzovaným s hemaglutininovým (Ha) tagem. Z transformovaných buněk jsem udělala fixované preparáty, které jsem následně použila pro imunolokalizaci. Jako primární protilátky jsem použila myši monoklonální protilátku proti Ha-tagu (1:1000) a primární králičí protilátku proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu (1:1000). Jako sekundární protilátky jsem použila protilátku proti myši primární protilátce značenou ALEXA FLUOR 488 (zelená, 1:1000) a protilátku proti primární králičí protilátce značenou ALEXA FLUOR 594 (červená, 1:1000). Jadernou DNA jsem značila DAPI. Kolokalizace ISF3 s hydrogenosomálním jablečným enzymem naznačuje hydrogenosomální lokalizaci ISF3 (obr. 16), čemuž odpovídá i přítomnost N – terminální hydrogenosomální signální sekvence v aminokyselinové sekvenci ISF3.

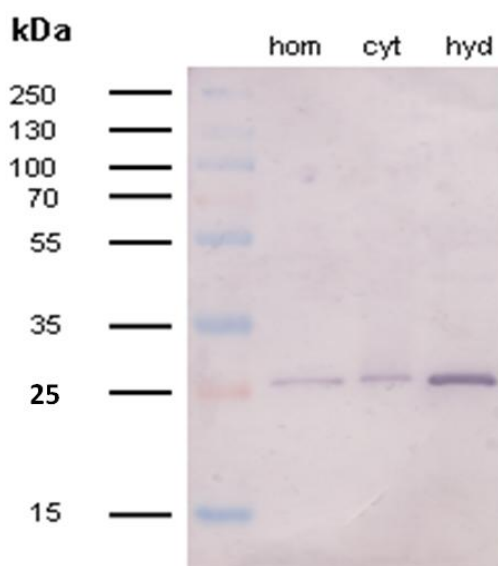


Obr. 16: Subcelulární lokalizace ISF3 pomocí nepřímé fluorescence. A, barvení jaderné

DNA pomocí DAPI; B, značení hydrogenosomálního jablečného enzymu; C, značení ISF3; D, kolokalizace DAPI a zeleného a červeného signálu naznačující lokalizaci ISF3 v hydrogenosomu.

6.5.2 Lokalizace Western blotovou analýzou

Pro Western blotovou analýzu lokalizace ISF3 v buněčných frakcích (buněčný lyzát, cytoplasma a hydrogenosomy) jsem použila ISF3 značený Ha-tagem. Jako primární protilátku jsem použila monoklonální Anti-Ha protilátka (myš, 1:1000) a jako sekundární protilátku jsem použila sekundární protilátku proti myšimu IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou (1:1000). Western blotová analýza ISF3 ukázala lokalizaci tohoto proteinu v hydrogenosomu (obr. 17). Přítomnost signálu ISF3 v cytoplasmě může být způsobena tím, že trichomonáda exprimuje hydrogenosomální proteiny v cytoplasmě, a tudíž jsme schopni detekovat ISF3 i tam.

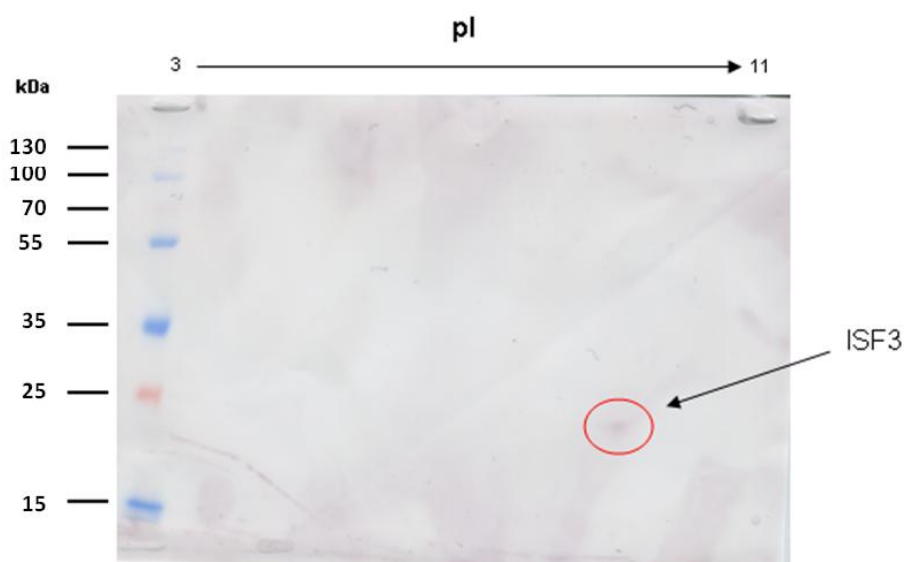


Obr. 17: Western blotová analýza buněčných frakcí - lokalizace ISF3 v *T. vaginalis*. kDa, standard molekulových hmotností; Hom, homogenát (buněčný lyzát); cyt, cytoplasma; hyd, hydrogenosomy.

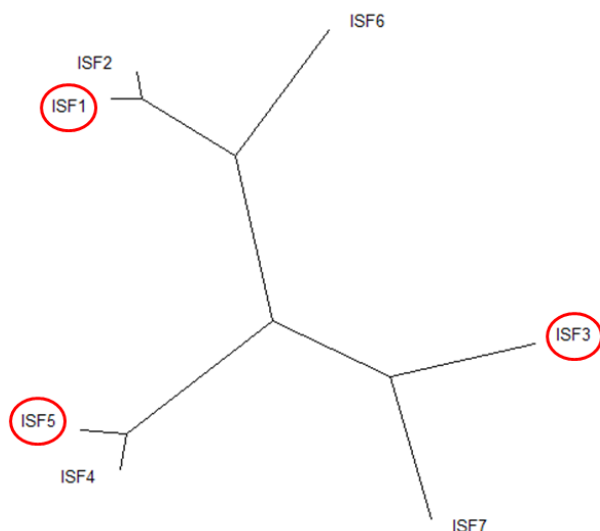
6.6 Kontrola specificity protilátky proti ISF3 pomocí 2D elektroforézy

T. vaginalis kóduje sedm paralogů ISF, z nichž alespoň tři byly identifikovány v hydrogenosomálním proteomu (Schneider *et al.*, 2011), proto jsem potřebovala určit specificitu připravené protilátky. Pro kontrolu specificity králičího polyklonálního antiséra

proti ISF3 (Eurogentec) jsem použila 2D elektroforézu a následnou Western blotovou analýzu. Jako primární protilátku jsem použila králičí antisérum (1:1000) a jako sekundární protilátku jsem použila antikráličí konjugát s alkalickou fosfatázou (1:1000). Z výsledku je patrné, že připravené králičí antisérum je specifické a značí pouze jediný protein. Přestože jsme jeho identitu nepotvrdili hmotnostní spektroskopií, předpokládáme, že označený protein je právě ISF3 na základě toho, že byl ISF3, spolu s ISF1 a ISF5, nalezen v proteomu hydrogenosomu ve dvou nezávislých studiích (Schneider *et al.*, 2011; laboratoř hmotnostní spektrometrie PřFUK – Tachezy a Jedelský, nepublikovaná data). Zároveň jak je vidět na obrázku 19, ISF3 se od ISF1 a ISF5 výrazně liší v aminokyselinové sekvenci. Ze všech genů železosirných flavoproteinů, které byly nalezeny u trichomonády, se ISF3 strukturně nejvíce podobá genu pro ISF7. Ten ovšem nebyl nalezen v proteomu hydrogenosomu trichomonády. Také pI ISF3 (pI=8,63) odpovídá označenému proteinu. Z toho všeho usuzujeme, že je naše protilátka proti ISF3 specifická a značí pouze ISF3 (obr. 18).



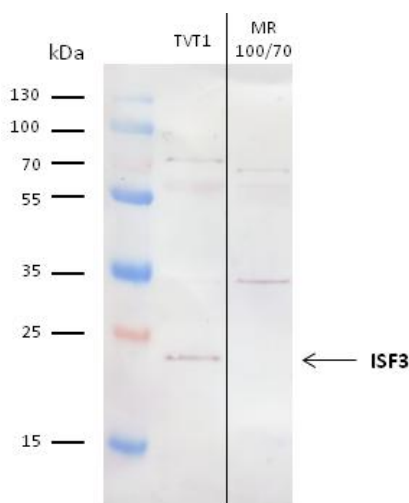
Obr. 18: Test polyklonálního antiséra proti ISF3. kDa, standard molekulových hmotností; pI, rozsah izoelektrických bodů.



Obr. 19: Porovnání aminokyselinových sekvencí genů železosírných flavoproteinů z *T. vaginalis*. Program TreeView, Clustal X.

6.7 Exprese ISF3 v *T. vaginalis* rezistentní k metronidazolu

Pro zjištění míry exprese ISF3 u *T. vaginalis* jsem použila Western blotovou analýzu lyzátů hydrogenosomů *T. vaginalis* izolovaných z buněk citlivých (TVT1) a vysoce rezistentních (MR 100/70) k metronidazolu. Každý vzorek obsahoval přibližně 20 µg proteinu. Jako primární protilátku jsem použila specifické králičí polyklonální antisérum (1:1000) a jako sekundární protilátku jsem použila antikráličí konjugát s alkalickou fosfatázou (1:1000). Western blotová analýza ukazuje úplnou ztrátu exprese ISF3 u kmene trichomonády vysoce rezistentního k metronidazolu (obr. 20).



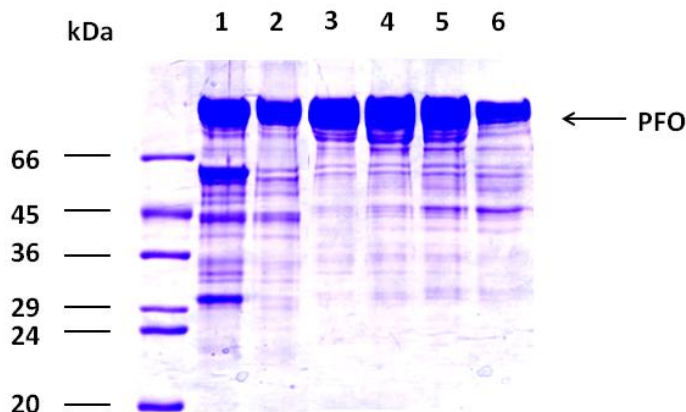
Obr. 20: Western blotová analýza hydrogenosomů *T. vaginalis* z kmenů citlivých a vysoce

rezistentních k metronidazolu. kDa, standard molekulových hmotností; TVT1, lyzát hydrogenosomů kmene *T. vaginalis* citlivého k metronidazolu; MR 100/70, lyzát hydrogenosomů kmene *T. vaginalis* vysoce rezistentního k metronidazolu.

6.8 Izolace PFO

PFO je u trichomonád donorem elektronů pro feredoxin, který pravděpodobně bude u trichomonády donorem elektronů pro ISF3. Proto ji bylo nutno vyizolovat, abychom ji následně mohli použít pro biochemické pokusy s ISF3.

PFO byla izolována ze solubilizovaných membrán hydrogenosomů na koloně s Ni-NTA agarózou. Při izolaci bylo využito skutečnosti, že hydrogenosomální jablečný enzym s podobnou nativní molekulovou hmotností jako PFO (cca 240 kDa) se specificky váže na Ni-NTA agarózu. Eluát z kolony obohacený o PFO byl přečištěn na koloně s náplní Superdexu 200 (kolona 10/300GL, GE Healthcare). Jednotlivé frakce izolace PFO byly analyzovány pomocí SDS proteinové elektroforézy (obr. 21). Vypurifikovaná PFO byla použita na měření biochemických aktivit ISF3.



Obr. 21: SDS proteinová elektroforéza izolace PFO. kDa, standard molekulových hmotností; 1, vzorek před nanesením na kolonu s Ni-NTA agarózou, tj. deoxycholátem solubilizované membrány hydrogenosomů (obsahuje i hydrogenosomální jablečný enzym); 2, vzorek po přečištění na koloně s Ni-NTA agarózou (již neobsahuje hydrogenosomální jablečný enzym); 3 – 6, jednotlivé frakce izolace PFO na koloně s náplní Superdexu 200.

6.9 Stanovení aktivity ISF3

Aktivitu ISF3 jsem měřila dvojím způsobem, neenzymatickou a enzymatickou redukcí ISF3 (sledovanou jako pokles absorbance proteinu v rozmezí cca 350-500 nm) s následnou

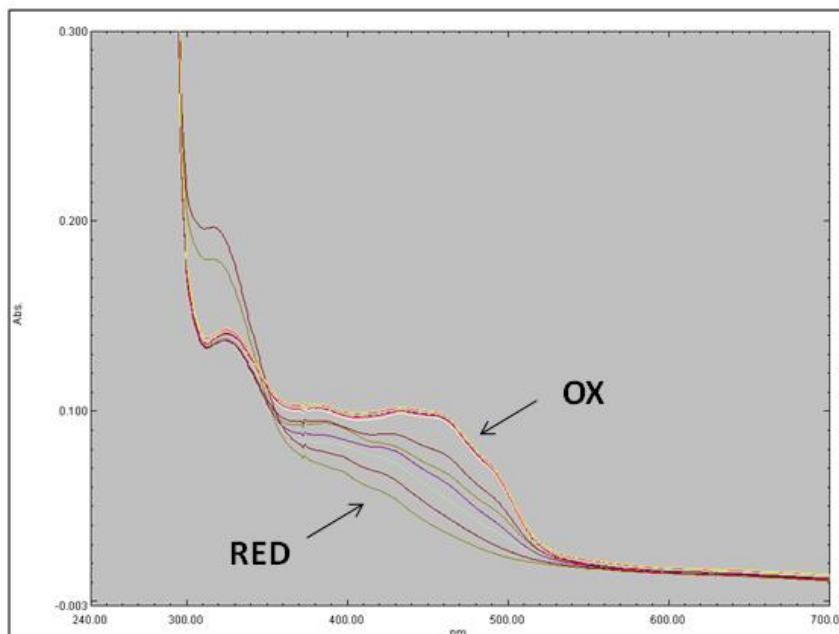
reoxidací různými akceptory elektronů na UV-VIS spektrofotometru. Neenzymaticky jsem ISF3 redukovala titrací dithioničitanem sodným (obr. 22). Enzymaticky jsem ISF3 úspěšně redukovala feredoxinem v systému s PFO (donorem elektronů pro feredoxin), čímž jsem potvrdila, že tato dráha je zřejmě schopna dodávat elektrony ISF i *in vivo* (obr. 24). Zredukovaný protein jsem zkoušela reoxidovat možnými akceptory elektronů jako je například kyslík (obr. 23), peroxid vodíku, dusičnan sodný nebo metronidazol (obr. 25). Reoxidace ISF3 kyslíkem, peroxidem vodíku, dusičnanem sodným i metronidazolem probíhala okamžitě po přidání akceptoru elektronů. Všemi čtyřmi zkoušenými akceptory elektronů jsem byla schopna ISF3 plně reoxidovat. Abych zamezila nechtěné oxidaci ISF3 kyslíkem přítomným v pufru a v kyvetě, probubla jsem kyvetu se vzorkem 10 minut dusíkem, jak je popsáno v kapitole 5.5.28. Jako další akceptor elektronů od ISF3 jsem zkusila síran amonný (obr. 26). V tomto případě ovšem reoxidace ISF3 probíhala velmi neochotně ve srovnání s předchozími testovanými akceptory elektronů a i po postupném zvyšování koncentrace síranu ve vzorku jsem nebyla schopna ISF3 reoxidovat více, než je patrné na obrázku 26. Z toho usuzuji, že síran amonný nebude akceptorem elektronů od ISF3.

Po reoxidaci ISF3 kyslíkem jsme se pokusili orientačně ověřit, zda při redukci došlo k vytvoření peroxidu vodíku nebo jestli je výsledkem redukce kyslíku voda. K tomu jsme použili kolorimetrickou assay s použitím diaminobenzidinu (DAB) a peroxidázy (HRP, horseradish peroxidase). Peroxidáza katalyzuje oxidaci DAB v přítomnosti peroxidu vodíku, a vzniká nerozpustný hnědý produkt. V našem případě k této reakci nedošlo, tudíž předpokládáme, že došlo k redukci kyslíku až na vodu jak je tomu v případě ISF z *M. thermophila*. V budoucnu je ovšem ještě zapotřebí tento pokus ověřit a zjistit produkty redukce dalších substrátů a vypočítat stechiometrii reakcí.

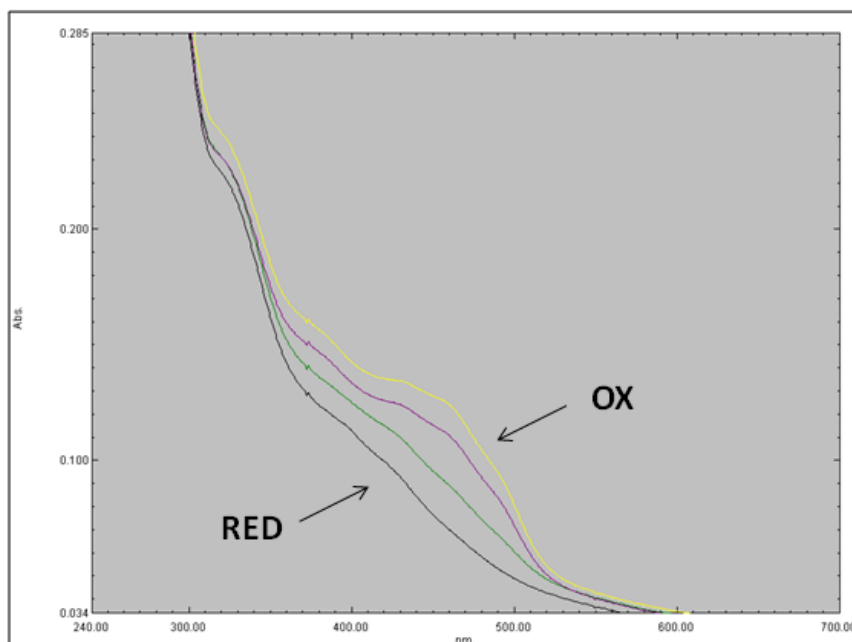
V průběhu měření enzymatických aktivit ISF3 jsem zjistila, že ISF3 neváže tolik železa ve svém aktivním centru, kolik bychom předpokládali. Z obrázků ve výsledcích je patrné, že poměr píku na 385 nm a píků flavinového centra se v jednotlivých měřeních enzymatických aktivit proteinu liší. To by mohlo naznačovat, že při jednotlivých izolacích proteinu obsahoval ISF3 různé množství železa.

Podle primární struktury ISF3, rozmístění cysteinů a na základě studií železosírného flavoproteinu u *M. thermophila* (Zhao *et al.*, 2001) jsem předpokládala, že ISF3 bude vázat 4 moly železa na 1 mol monoméru ISF3. Ovšem při spektrofotometrickém stanovení železa jsem naměřila pouze 1 mol železa na 1 mol monoméru proteinu. To může být důsledkem nedostatečného navázání železa do aktivního centra proteinu a nebo je to důsledek toho, že

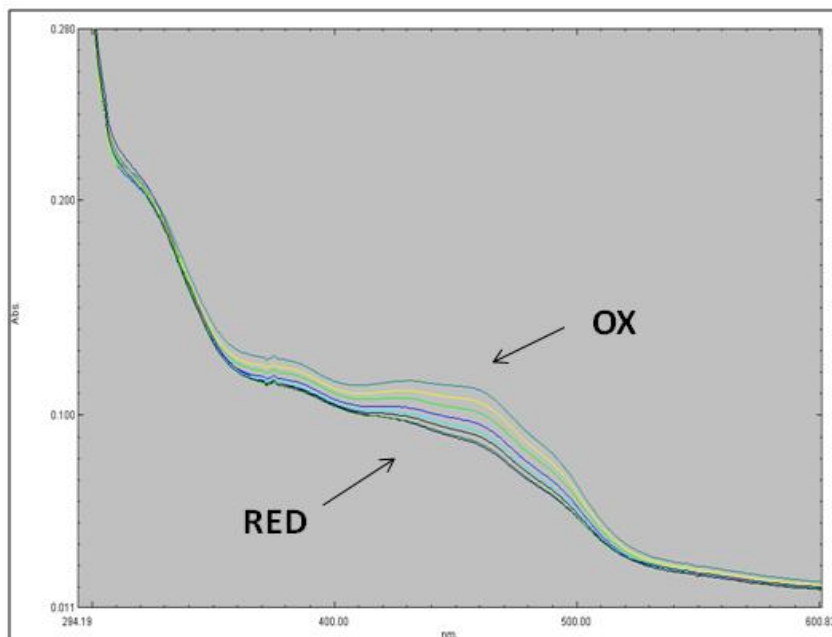
pouze omezené množství proteinu je správně naklastrováno. Tento fakt může výrazně ovlivňovat naše biochemické pokusy a tudíž naše výsledky nemůžeme považovat za definitivní.



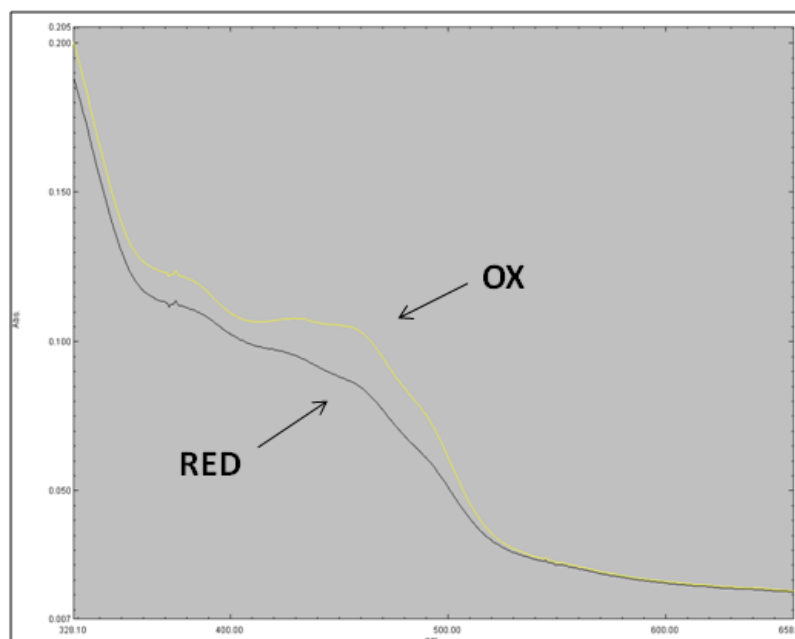
Obr. 22: UV-VIS spektrum postupné redukce afinitně purifikovaného ISF3-His dithioničitanem sodným.



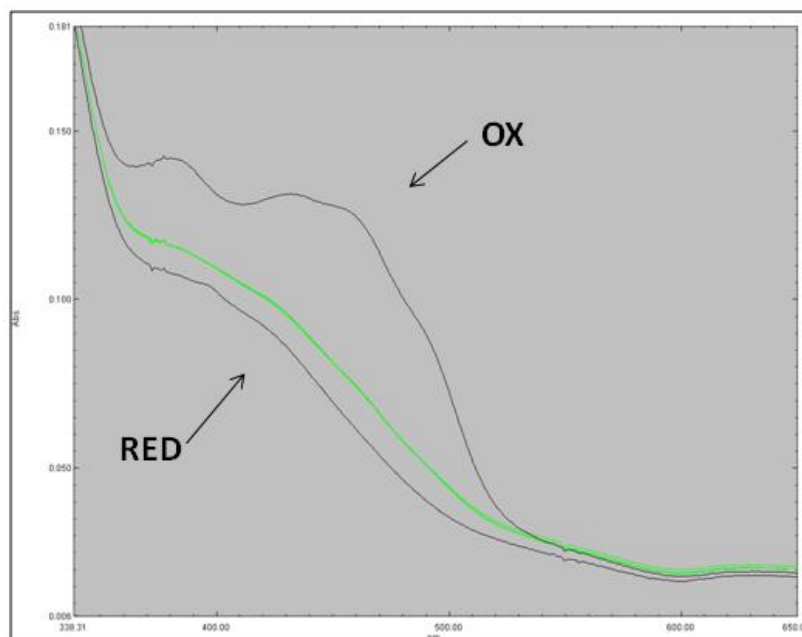
Obr. 23: UV-VIS spektrum afinitně purifikovaného ISF3-His redukovaného dithioničitanem sodným a jeho následná reoxidace kyslíkem.



Obr. 24: UV-VIS spektrum postupné redukce afinitně purifikovaného ISF3-His v systému ferredoxin – PFO.



Obr. 25: UV-VIS spektrum afinitně purifikovaného ISF3-His redukovaného v systému ferredoxin – PFO a jeho následná reoxidace 10 mM metronidazolem.



Obr. 26: UV-VIS spektrum afinitně purifikovaného ISF3-His redukovaného v systému feredoxin – PFO a jeho následná reoxidace 4 M roztokem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (zelená křivka).

7 Diskuse

Trichomonas vaginalis je sexuálně přenosný parazit člověka a s prevalencí okolo 170 mil. případů ročně je původcem nejčastější nevírové sexuálně přenosné choroby na světě (WHO, 2001).

V roce 2007 byl ukončen genomový projekt *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007) a v rámci tohoto projektu byla nalezena řada proteinů s dosud neznámou funkcí, mimo jiné také sedm paralogů železosírných flavoproteinů. Tyto flavoproteiny mají hydrogenosomální signální sekvenci a podle nejnovějších studií jsou tři z nich exprimovány v hydrogenosomu *T. vaginalis* (Schneider *et al.*, 2011). Jediná další eukaryota s identifikovanými ISF (v rámci genomových projektů) jsou zástupci rodu *Entamoeba*, ale ani u nich funkce ISF není dosud známa.

Železosírné flavoproteiny jsou rozšířené především u anaerobních prokaryot (Zhao *et al.*, 2001). Podle výsledků studia železosírného flavoproteinu archebakterie *M. thermophila*, homologu železosírných flavoproteinů *T. vaginalis*, jsou ISF tohoto typu terminální oxidoreduktázy kyslíku a peroxidu vodíku, čímž přispívají k detoxifikaci těchto sloučenin a brání tak vzniku oxidativního stresu v buňce. Donorem elektronů pro ISF u archebakterie *M. thermophila* je feredoxin (Cruz & Ferry, 2006). Vzhledem k tomu, že ISF u trichomonády mají hydrogenosomální signální sekvenci a zároveň dvě nezávislé proteomické studie hydrogenosomu prokázaly hydrogenosomální lokalizaci tří ISF (ISF1, ISF3, ISF5) ze sedmi (Schneider *et al.*, 2011; laboratoř hmotnostní spektrometrie PřFUK), dá se předpokládat, že i u trichomonády budou ISF fungovat analogicky jako charakterizovaný homolog a budou využívat feredoxin jako donor elektronů.

Na základě toho, že nebylo v mých silách zkoumat funkci všech sedmi homologů ISF u trichomonády najednou, provedla jsem jako jeden z prvních pokusů qRT-PCR s cílem vytipovat paralog, který bude s největší pravděpodobností exprimován. Zaměřila jsem se rovněž na porovnání exprese těchto proteinů u trichomonád citlivých a rezistentních k metronidazolu, s cílem zjistit, zda tyto předpokládané oxidoreduktázy nebudou měnit expresi v závislosti na rezistenci k metronidazolu. Nejen že jsem zjistila, že se exprese železosírných flavoproteinů u těchto dvou linií trichomonád mění, ale byla jsem také schopna na základě našich výsledků, ex post podpořených výsledky proteomických dat (Schneider *et al.*, 2011; laboratoř hmotnostní spektrometrie PřFUK), vytipovat dominantně transkribovaný protein ISF3 (TVAG_154730) a zaměřila jsem se na jeho biochemickou a fyzikální charakterizaci.

Z výsledků qRT-PCR jsem zjistila, že železosírné flavoproteiny u trichomonády jsou transkribované různě a že se transkripce ISF mění i v závislosti na tom, zda jsou trichomonády rezistentní k metronidazolu, či nikoliv. Z výsledků plyne, že nejvíce transkribované ISF u trichomonád citlivých k metronidazolu jsou ISF3 a ISF5, což je v souladu s výsledky z proteomu hydrogenosomu trichomonády (Schneider *et al.*, 2011; laboratoř hmotnostní spektrometrie PřFUK), kde byl ovšem ještě navíc nalezen ISF1, který je sice podle qRT-PCR u trichomonád citlivých i rezistentních k metronidazolu transkribován, ale zdaleka ne v takové míře jako ISF3 a ISF5. Transkripce ISF3 i ISF5 výrazně klesá u buněk rezistentních k metronidazolu. Tento fakt byl pro ISF3 potvrzen i pomocí specifické protilátky (obr. 20). ISF4, ISF6 a ISF7 jsou podle výsledků dat z qRT-PCR transkribované u obou linií trichomonád jen velmi málo a nebyly nalezeny ani v proteomu hydrogenosomu trichomonády. Co se týče ISF2, je to jediný ze sedmi ISF, který je transkribovaný více u trichomonád rezistentních k metronidazolu.

Předpokládáme-li, že je ISF3 opravdu schopný redukovat metronidazol, tak fakt, že klesá transkripce ISF3 u rezistentních buněk by mohl být způsoben jednak tím, že se buňka snaží eliminovat proteiny, které se podílí na redukcí metronidazolu. Tento efekt byl již popsán pro PFO, hydrogenázu a hydrogenosomální jablečný enzym, kdy trichomonáda rezistentní k metronidazolu ztrácí aktivitu těchto enzymů (Kulda, 1999) a také u ní klesá exprese feredoxinu (Yarlett *et al.*, 1986). Zároveň ale nemůžeme vyloučit, že se jedná o sekundární ztrátu exprese ISF3 právě v důsledku poklesu exprese feredoxinu a aktivity PFO, kdy ISF3 ztrácí zdroj elektronů.

Zajímavé je, že podle výsledků qRT-PCR buňky rezistentní k metronidazolu zvyšují míru transkripce ISF2. To by mohlo znamenat, že ISF2 nemá stejnou funkci jako ISF3, není schopen redukce metronidazolu a tudíž není potřeba snižovat míru jeho transkripce. Otázkou ovšem zůstává, zda je ISF2 u buněk rezistentních k metronidazolu opravdu transkribován, neboť tyto výsledky nebyly potvrzeny proteomickými daty.

Abychom mohli studovat fyziologickou funkci ISF3, připravila jsem rekombinantní protein overexpresí v buňkách *E. coli* BL21 (DE3). Zaklonovala jsem ISF3 do vektoru pET-42b s C-terminálním His-tagem a vypurifikovaný ISF3-His jsem použila na měření enzymatických aktivit, stanovení molekulové hmotnosti, charakterizaci kofaktoru a železosírného centra. Dále jsem zaklonovala ISF3 s hydrogenosomální signální sekvencí do vektoru TagVag s Ha-tagem. Tímto konstruktem (ISF3-Ha) transformované trichomonády jsem použila pro demonstrování buněčné lokalizace ISF pomocí imunologických technik.

Hydrogenosomální lokalizaci ISF3 jsem ověřila pomocí Western blotové analýzy subcelulárních frakcí *T. vaginalis* a pomocí imunofluorescence s použitím ISF3 se signální sekvencí a značeného hemaglutininovým tagem. Identita hydrogenosomů byla ověřena pomocí protilátky proti jablečnému enzymu, jenž je používán jako hydrogenosomální marker enzym. Vzhledem k tomu, že ISF3 s hydrogenosomálním jablečným enzymem kolokalizuje, prokázala jsem jeho hydrogenosomální lokalizaci. Zároveň i Western blotová analýza ukázala lokalizaci ISF3 v hydrogenosomu.

Molekulovou váhu jsem stanovovala gelovou filtrační chromatografií. Na SDS proteinové elektroforéze a imunoblotu vidíme ISF3 jako cca 26,5 kDa velký polypeptid. Molekulovou hmotnost nativního proteinu jsem gelovou filtrační chromatografií stanovila přibližně na 51,6 kDa. Díky tomu předpokládáme, že je nativní ISF3 dimer, stejně tak jako ISF *M. thermophila*, kde byla hmotnost monomeru stanovena na 29 kDa a hmotnost nativního proteinu gelovou filtrační chromatografií na 65 kDa (Latimer *et al.*, 1996).

Podle studií ISF u archebakterie *M. thermophila* má tento protein ve svém aktivním centru jako kofaktor FMN (Latimer *et al.*, 1996). Abych zjistila, jaký kofaktor se nachází v aktivním centru ISF3 *T. vaginalis*, napěstovala jsem expresní buňky bez přídavku FMN a porovnála jsem kofaktor izolovaný z ISF3 se standardy FMN a FAD pomocí TLC. Retenční faktor vypočítaný pro vzorek z trichomonády odpovídal retenčnímu faktoru vypočítanému pro FMN. Tudíž předpokládáme, že ISF3 z *T. vaginalis* váže jako kofaktor FMN.

ISF u archebakterie *M. thermophila* obsahuje ve svém aktivním centru jeden [4Fe4S] klastr na monomer, který zprostředkovává přenos elektronů z feredoxinu na FMN (Cruz & Ferry, 2006). Stanovení železosírného centra u ISF3 jsem prováděla pomocí fotometrického stanovení koncentrace železa ve vzorku proteinu a také pomocí EPR spektroskopie (Dr. A. Pierik, Philipps-Universität Marburg, Německo), která byla bohužel bez výsledku. Předpokládala jsem, že stejně jako ISF u *M. thermophila* bude ISF3 trichomonád také vázat [4Fe4S] klastr na monomer. Bohužel při spektrofotometrickém měření obsahu železa v ISF3 jsem naměřila pouze 1 mol železa na 1 mol monomeru proteinu. Vzhledem k těmto výsledkům usuzuji, že rekombinantní ISF3 obsahuje substechiometrické množství železa, což svědčí pro nízký podíl holoproteinu se správně zformovaným železosírným centrem v celkovém proteinovém preparátu, ale také by se mohlo jednat o nedostatečně naklastrované železosírné centrum. Pro další experimenty s ISF3 je tudíž nutné zkusit jiné podmínky kultivace expresních buněk, popřípadě izolovat ISF3 přímo z *T. vaginalis*. Na tom nyní pracuje Tamara Smutná, které se podařilo vyizolovat ISF3 z buněk *E. coli* pěstovaných

za anaerobních podmínek s přidavkem železa, síry a FMN, který váže 2 moly železa a 2 moly síry na 1 mol proteinu. Tento fakt naznačuje, že by se mohlo jednat o protein s [2Fe2S] klastrem v aktivním centru. Nicméně i s proteinovým vzorkem, který jsem měla k dispozici já, s nižším než stechiometrickým množstvím železa, jsem byla schopna naměřit enzymatickou aktivitu ISF3. To naznačuje, že by se mohlo jednat spíše o situaci, kdy je v proteinovém vzorku určité i když malé množství proteinu správně naklastrováno.

Pro ověření míry exprese a lokalizace v liniích trichomonád citlivých a rezistentních k metronidazolu jsem nechala připravit protilátku, jejíž specifitu jsem ověřila 2D elektroforézou s následnou Western blotovou analýzou. Specifitu vyrobené protilátky bylo zapotřebí ověřit kvůli tomu, že genom trichomonády kóduje sedm homologních genů pro ISF. Na základě našich výsledků z 2D elektroforézy, odpovídajícímu pI a také na základě výsledků proteomických dat hydrogenosomu trichomonády, kde byly nalezeny pouze ISF1, ISF3 a ISF5, přičemž primární sekvence ISF1 a ISF5 se od ISF3 výrazně liší, jsme přesvědčeni, že protilátka proti ISF3 je specifická.

Pomocí spektrofotometrických metod jsem se pokusila zjistit enzymatickou aktivitu ISF3. Zkusila jsem redukcí proteinu titrací dithioničitanem sodným a následnou reoxidací kyslíkem a dalšími potenciálními akceptory elektronů (peroxid vodíku, dusičnan sodný, metronidazol). Redukce ISF3 i následná reoxidace vyjmenovanými akceptory elektronů probíhaly velmi ochotně a prakticky ihned. Podařilo se mi též redukovat ISF3 v systému s předpokládaným fyziologickým donorem elektronů – feredoxinem, v systému s PFO. To, že dochází k redukcí ISF3 opravdu feredoxinem a ne pomocí PFO jsme zjistila jednoduše tím, že jsem se pokusila zredukovat ISF3 pouze s PFO. V tomto případě ovšem k redukcí nedošlo a ISF3 jsem zredukovala pouze po přidání feredoxinu. Jako další akceptor elektronů od ISF3 jsem zkusila síran amonný, v tomto případě v podstatě nedocházelo k reoxidaci ISF3 ve srovnání s předchozími testovanými akceptory elektronů. Výsledky biochemických měření naznačují, že ISF3 by mohl, stejně jako ISF u *M. thermophila*, fungovat vedle FDP jako další hydrogenosomální terminální oxidoreduktáza. Mohl by tudíž redukovat kyslík a peroxid vodíku na vodu a tím detoxifikovat tyto pro buňku toxické látky. To naznačuje i výsledek z pokusu, kdy po redukcí kyslíku pomocí ISF3 nebyl ve vzorku přítomen peroxid. Předpokládáme tedy, že redukce kyslíku u trichomonády bude mít stejný průběh jako u methanosarciny, tudíž že bude kyslík reukován na vodu. To je ovšem ještě nutné potvrdit.

Další funkcí ISF3, jak naznačují výsledky, by mohla být i redukce metronidazolu, který jsme se pokoušeli zredukovat pomocí ISF3 v systému s PFO a feredoxinem. Podle

našich pokusů k redukci opravdu docházelo, ovšem nevíme, jestli touto redukcí dochází k aktivaci metronidazolu na toxický radikál a nebo zda může docházet k jeho úplné detoxifikaci na amin, k té je zapotřebí šesti elektronů. Víme, že ISF u *M. thermophila* je schopný redukce kyslíku na vodu (Cruz & Ferry, 2006) a podle našich výsledků je této redukce schopen i ISF3 z *T. vaginalis*. K této reakci je zapotřebí čtyř elektronů. Existuje tedy možnost, že dochází k redukci metronidazolu čtyřmi elektrony na hydroxylamin. Víme také, že ISF3 je díky FMN schopen dvouelektronové redukce a nelze tedy vyloučit, že by ISF3 mohl redukovat metronidazol i šesti elektrony na netoxický amin. Proto je v budoucnu nutné zaměřit se i na produkty redukce metronidazolu.

Vzhledem k faktu, že podle našich výzkumů je ISF3 schopný redukovat i dusíkaté sloučeniny jako je dusičnan sodný, bylo by v budoucnu dobré vyzkoušet jako akceptor elektronů od ISF3 také NO. To proto, že například FDP je u bakterií schopen kromě kyslíku redukovat také NO, který buňkám způsobuje nitrosativní stres.

Vzhledem k tomu, že je velmi pravděpodobné, že rekombinantní ISF3 obsahuje substechiometrické množství železa, než jaké bychom předpokládali pro [4Fe4S] protein (na základě jeho primární struktury a výsledků publikovaných o ISF u *M. thermophila*), nemůžeme brát námi naměřené výsledky jako definitivní.

8 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem měla za úkol charakterizovat železosírné flavoproteiny z hydrogenosomu anaerobního prvoka *T. vaginalis*. Železosírné flavoproteiny se nacházejí především u anaerobních prokaryot, ale byly nalazeny i u eukaryot, jmenovitě u *T. vaginalis*, ale například také u dalšího anaerobního prvoka *Entamoeba histolytica*. Železosírné flavoproteiny *T. vaginalis* jsou homologní s ISF archebakterie *M. thermophila*, kde ISF plní roli terminální oxidoreduktázy a redukuje kyslík a peroxid vodíku na vodu.

- Připravila jsem různé konstrukty ISF3 (ISF3-His, ISF3-Ha).
- Lokalizovala jsem ISF3 v buňkách *T. vaginalis* a to jak pomocí Western blotové analýzy, tak pomocí imunofluorescenční mikroskopie fixovaných preparátů trichomonád. Prokázala jsem lokalizaci ISF3 v hydrogenosomech.
- Rekombinantní ISF3-His jsem použila na charakterizaci biochemických vlastností a na měření enzymatických aktivit ISF3.
- Pomocí TLC jsem určila flavinový kofaktor ISF3 jako FMN.
- Gelovou filtrační chromatografií jsem stanovila molekulovou hmotnost nativního proteinu na přibližně 51,6 kDa. Vzhledem k tomu, že na SDS proteinové elektroforéze má ISF3 velikost přibližně 26,5 kDa, je nativní ISF3 dimer. To koresponduje s výsledkem určení molekulové hmotnosti ISF u archebakterie *M. thermophila*, kde je ISF též dimerní protein.
- Obsah železa v proteinu jsme měřili spektrofotometricky pomocí 2,4,6-tri(2-pyridyl)-S-triazinu metodou popsanou v publikaci D. S. Fischera. Bohužel jsem v ISF3 naměřila pouze substechiometrické množství železa než bychom pro tento protein předpokládali (4 moly železa na jeden mol monomeru proteinu). Předpokládáme, že ISF3 není správně naklastrovaný a je tedy pravděpodobně nutné upravit podmínky pěstování expresních bakterií, popřípadě pokusit se izolovat ISF3 z *T. vaginalis*.

- Nechala jsme připravit specifickou protilátku proti ISF3 na ověření míry exprese ISF3 u buněk citlivých a vysoce rezistentních k metronidazolu.
- Porovnáním míry exprese ISF3 u buněk citlivých a vysoce rezistentních k metronidazolu pomocí qRT-PCR a také pomocí Western blotové analýzy jsem zjistila, že u rezistentních linií hladina exprese ISF3 klesá a pomocí Western blotové analýzy není exprese ISF3 u rezistentních linií trichomonád vůbec detekovatelná.
- ISF3 lze redukovat jak neenzymaticky dithioničitanem sodným, tak enzymaticky feredoxinem v systému s PFO. Redukovaný ISF3 lze dále reoxidovat například kyslíkem, peroxidem vodíku, dusičnanem sodným, ale i metronidazolem. Tudíž by ISF3 mohl plnit funkci terminální oxidázy a detoxifikovat kyslík a peroxid vodíku na vodu, jak je tomu u *M. thermophila*. Mohl by ale také být schopen redukovat metronidazol, popřípadě i jiné dusíkaté sloučeniny. V budoucnu bude nutné tyto předpokládané aktivity s plně naklastrovaným proteinem znovu ověřit.

9 Seznam použité literatury

Arroyo, R., Gonzalezrobles, A., Martinezpalomo, A. & Alderete, J. F. (1993). Signaling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology* **7**, 299-309.

Becker, D. F., Leartsakulpanich, U., Surerus, K. K., Ferry, J. G. & Ragsdale, S. W. (1998). Electrochemical and spectroscopic properties of the iron-sulfur flavoprotein from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26462-26469.

Benchimol, M., Almeida, J. C. A. & deSouza, W. (1996). Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue & Cell* **28**, 287-299.

Benchimol, M. & deSouza, W. (1983). Fine-structure and cyto-chemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Protozoology* **30**, 422-425.

Benchimol, M. & Engelke, F. (2003). Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biology of the Cell* **95**, 283-293.

Benchimol, M., Pereira, M. E. A., Elias, C. A. & deSouza, W. (1981). Cell-surface carbohydrates in *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Protozoology* **28**, 337-341.

Bozner, P. (1997). Immunological detection and subcellular localization of HSP70 and HSP60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* **83**, 224-229.

Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plumper, E. & Johnson, P. J. (1997). Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: Similarities with mitochondrial protein import. *Embo Journal* **16**, 3484-3493.

Brugerolle, G. (1972). Caractérisation ultrastructurale et cytochimique de deux types de granules cytoplasmiques chez les *Trichomonas*. *Protistologica* **8**, 353 - 363.

Brugerolle, G. (1975). Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenese de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de Trichomonadines primitives. *Protistologica* **11**, 457 - 468.

Brugerolle, G. (1975 - 1976). Cytologie ultrastructurale, systématique et évolution des Trichomonadida. *Ann. Station Biol. Besse-en-Chandesse* **10**, 1 - 57.

Bui, E. T. N., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **93**, 9651-9656.

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

Cavalier - Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* **271**, 1251 - 1262.

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

Clements, A. P. & Ferry, J. G. (1992). Cloning, nucleotide-sequence, and transcriptional analyses of the gene encoding a ferredoxin from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology* **174**, 5244-5250.

Clements, A. P., Kilpatrick, L., Lu, W. P., Ragsdale, S. W. & Ferry, J. G. (1994). Characterization of the iron-sulfur clusters in ferredoxin from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology* **176**, 2689-2693.

Coombs, G., Müller, M. (1995) In: Biochemistry and molecular biology of parasites. Eds Marr, M. and Müller, M. Academic Press Ltd., pp. 33 - 47.S

Cotch, M. F., Pastorek, J. G., Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., Eschenbach, D. A., Edelman, R., Carey, J. C., Regan, J. A., Krohn, M. A., Klebanoff, M. A., Rao, A. V., Rhoads, G. G., Yaffe, S. J., Catz, C. S., McNellis, D., Berendes, H. W., Blackwelder, W. C., Kaslow, R. A., Reed, G. F., Greenberg, E. M., Williams, S. & Rettig, P. J. (1997). *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually Transmitted Diseases* **24**, 353-360.

Cruz, F. & Ferry, J. G. (2006). Interaction of iron-sulfur flavoprotein with oxygen and hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1760**, 858-864.

Čerkasov, J., Čerkasovová, A., Kulda, J. & Vilhelmová, D. (1978). Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. 1. Adp-dependent oxidation of malate and pyruvate. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 1207-1214.

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

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

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

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

Dunne, R. L., Dunn, L. A., Upcroft, P., O'Donoghue, P. J. & Upcroft, J. A. (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* **13**, 239-249.

Dyall, S. D. & Johnson, P. J. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 404-411.

- Dyall, S. D., Yan, W. H., Delgadillo-Correa, M. G., Lunceford, A., Loo, J. A., Clarke, C. F. & Johnson, P. J. (2004).** Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature* **431**, 1103-1107.
- Edwards, D. I. (1993a).** Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. 1. Mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**, 9-20.
- Edwards, D. I. (1993b).** Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. 2. Mechanisms of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**, 201-210.
- Ellis, J. E., Yarlett, N., Cole, D., Humphreys, M. J. & Lloyd, D. (1994).** Antioxidant defenses in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis* - comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology-Uk* **140**, 2489-2494.
- Fenchel, T. & Finlay, B. J. (1991).** The biology of free-living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology* **26**, 201-215.
- Finlay, B. J. & Fenchel, T. (1989).** Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *Fems Microbiology Letters* **65**, 311-314.
- Fischer, D. S. & Price, D. C. (1964).** Simple serum iron method using new sensitive chromogen tripyridyl-S-triazine. *Clinical Chemistry* **10**, 21-&.
- Fouts, A. C. & Kraus, S. J. (1980).** *Trichomonas vaginalis* - re-evaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *Journal of Infectious Diseases* **141**, 137-143.
- Gorrell, T. E., Yarlett, N. & Müller, M. (1984).** Isolation and characterization of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin. *Carlsberg Research Communications* **49**, 259-268.
- Gram, I. T., Macaluso, M., Churchill, J. & Stalsberg, H. (1992).** *Trichomonas vaginalis* (Tv) and human papillomavirus (Hpv) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (Cin) grade-III. *Cancer Causes & Control* **3**, 231-236.
- Grodstein, F., Goldman, M. B. & Cramer, D. W. (1993).** Relation of tubal infertility to history of sexually-transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology* **137**, 577-584.
- Halliwell, B. (1989).** Tell me about free-radicals, doctor - A review. *Journal of the Royal Society of Medicine* **82**, 747-752.

- Hardy, P. H., Nell, E. E., Spence, M. R., Hardy, J. B., Graham, D. A. & Rosenbaum, R. C. (1984).** Prevalence of 6 sexually-transmitted Disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. *Lancet* **2**, 333-337.
- Heath, J. P. (1981).** Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial-cell cultures - A study by light and scanning electron-microscopy. *British Journal of Venereal Diseases* **57**, 106-117.
- Honigberg, B. M. & King, V. M. (1964).** Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. *Journal of Parasitology* **50**, 345-&.
- Honigberg, B. M., Volkmann, D., Entzeroth, R. & Scholtyssek, E. (1984).** A freeze-fracture electron-microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). *Journal of Protozoology* **31**, 116-131.
- Hrdý, I., Hirt, R. P., Doležal, P., Bardoňová, L., Foster, P. G., Tachezy, J. & Embley, T. M. (2004).** Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**, 618-622.
- Hrdý, I., Tachezy, J., Müller, M. (2007).** Metabolism of Trichomonad Hydrogenosomes. In: Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes. Ed. Tachezy, J., Microbiology Monographs, Springer - Verlag Berlin Heidelberg.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995a).** Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate, ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 388-396.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995b).** Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**, 593-603.
- Jenkins, T. M., Gorrell, T. E., Müller, M. & Weitzman, P. D. J. (1991).** Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas fetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **179**, 892-896.

- Johnson, P. J., Doliveira, C. E., Gorrell, T. E. & Müller, M. (1990).** Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **87**, 6097-6101.
- Johnson, P. J., Bradley, P. J., Lathi, C. J. (1995).** Cell Biology of Trichomonads: Protein targeting to the hydrogenosome. In Boothroyd, J. C. and Komuniecki, R. (eds). *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley-Liss, New York. pp. 399 - 411.
- Johnston, V.J., Mabley, D.C. (2008).** Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current opinion in infectious diseases* **21**, 56 - 64.
- Johnson, P. J., Lahti, C. J. & Bradley, P. J. (1993).** Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* **79**, 664-670.
- Kharsany, A. B. M., Hoosen, A. A., Moodley, J., Bagaratee, J. & Gouws, E. (1993).** The association between sexually-transmitted pathogens and cervical intraepithelial neoplasia in a developing community. *Genitourinary Medicine* **69**, 357-360.
- Kulda, J. (1999).** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology* **29**, 199-212.
- Kulda, J., Nohýnková, E., Ludvík, J. (1986).** Basic structure and function of the trichomonad cell. *Acta Universitatis Carolinae - Biologica* **30**, 181 - 189.
- Kulda, J., Hrdý, I. (2007).** Hydrogenosome: The Site of 5-Nitroimidazole Activation and Resistance. In: Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes. Ed. Tachezy, J., Microbiology Monographs, Springer - Verlag Berlin Heidelberg.
- Laga, M., Alary, M., Nzila, N., Manoka, A. T., Tuliza, M., Behets, F., Goeman, J., Stlouis, M. & Piot, P. (1994).** Condom promotion, sexually-transmitted diseases treatment, and declining incidence of Hiv-1 infection in female Zairian sex workers. *Lancet* **344**, 246-248.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., Heyward, W. L., Ryder, R. W. & Piot, P. (1993).** Non-ulcerative sexually-transmitted diseases as risk-factors for Hiv-1 transmission in women - Results from a cohort study. *Aids* **7**, 95-102.

Lahti, C. J., Doliveira, C. E. & Johnson, P. J. (1992). Beta-succinyl-Coenzyme-A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of Bacteriology* **174**, 6822-6830.

Lahti, C. J. & Johnson, P. J. (1991). *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **46**, 307-310.

Larsen, W. J. (1970). Genesis of mitochondria in insect fat body. *Journal of Cell Biology* **47**, 373-&.

Latimer, M. T., Painter, M. H. & Ferry, J. G. (1996). Characterization of an iron-sulfur flavoprotein from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 24023-24028.

Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F. & Duchene, M. (2009). *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular Microbiology* **72**, 518-536.

Lindmark, D. G. & Müller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 7724-7728.

Linstead, D. J. & Bradley, S. (1988). The purification and properties of 2 soluble reduced nicotinamide - acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **27**, 125-134.

Lloyd, D. & Kristensen, B. (1985). Metronidazole inhibition of hydrogen production *in vivo* in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of General Microbiology* **131**, 849-853.

Lloyd, D. & Pedersen, J. Z. (1985). Metronidazole radical-anion generation *in vivo* in *Trichomonas vaginalis* - Oxygen quenching is enhanced in a drug-resistant strain. *Journal of General Microbiology* **131**, 87-92.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- McGonigle, S., Dalton, J. P. & James, E. R. (1998).** Peroxidoxins: A new antioxidant family. *Parasitology Today* **14**, 139-145.
- Meingassner, J. G., Havelec, L. & Mieth, H. (1978).** Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. *British Journal of Venereal Diseases* **54**, 72-76.
- Meyer, J. & Gagnon, J. (1991).** Primary structure of hydrogenase-I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **30**, 9697-9704.
- Minkoff, H., Grunebaum, A. N., Schwarz, R. H., Feldman, J., Cummings, M., Crombleholme, W., Clark, L., Pringle, G. & McCormack, W. M. (1984).** Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes - A prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **150**, 965-972.
- Müller, M. (1993).** The Hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* **139**, 2879-2889.
- Müller, M. & Lindmark, D. G. (1978).** Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. 2. Effect of CoA on pyruvate oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 1215-1218.
- Mukherjee, M., Brown, M. T., McArthur, A. G., Johnson, P. J. (2006).** Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* **5**, 2062 - 2071.
- Paget, T. A. & Lloyd, D. (1990).** *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Molecular and Biochemical Parasitology* **41**, 65-72.
- Payne, M. J., Chapman, A. & Cammack, R. (1993).** Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Febs Letters* **317**, 101-104.
- Pfanner, N. & Geissler, A. (2001).** Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 339-349.

- Plumper, E., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (1998).** Implications of protein import on the origin of hydrogenosomes. *Protist* **149**, 303-311.
- Plumper, E., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (2000).** Competition and protease sensitivity assays provide evidence for the existence of a hydrogenosomal protein import machinery in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **106**, 11-20.
- Pütz, S., Gelius-Dietrich, G., Piotrowski, M. & Henze, K. (2005).** Rubrerythrin and peroxiredoxin: Two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **142**, 212-223.
- Quon, D. V. K., Doliveira, C. E. & Johnson, P. J. (1992).** Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **89**, 4402-4406.
- Samuels, R. (1980).** Chromosome morphology of *Tritrichomonas augusta*. *Journal of Protozoology* **27**, A39-A40.
- Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyall, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y. M., Loo, J. A. & Johnson, P. J. (2011).** The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *International Journal for Parasitology* **41**, 1421-1434.
- Smutná, T., Goncalves, V. L., Saraiva, L. M., Tachezy, J., Teixeira, M. & Hrdý, I. (2009).** Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryotic Cell* **8**, 47-55.
- Snyers, L., Hellings, P., Bovykesler, C. & Thinessempoux, D. (1982).** Occurrence of hydrogenosomes in the rumen ciliates *Ophryoscolecidae*. *Febs Letters* **137**, 35-39.
- Šut'ák, R., Doležal, P., Fiumera, H. L., Hrdý, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P. J., Müller, M. & Tachezy, J. (2004).** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**, 10368-10373.

- Tandler, B. & Hoppel, C. L. (1973).** Division of giant mitochondria during recovery from cuprizone intoxication. *Journal of Cell Biology* **56**, 266-272.
- Thong, K. W. & Coombs, G. H. (1987).** Comparative study of ferredoxin linked and oxygen metabolizing enzymes of Trichomonads. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **87**, 637-641.
- van der Giezen, M., Slotboom, D. J., Horner, D. S., Dyal, P. L., Harding, M., Xue, G. P., Embley, T. M. & Kunji, E. R. S. (2002).** Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *Embo Journal* **21**, 572-579.
- Vidakovič, M. S., Fraczkiewicz, G. & Germanas, J. P. (1996).** Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14734-14739.
- Wagner, G. & Levin, R. (1978).** Oxygen tension of vaginal surface during sexual stimulation in human. *Fertility and Sterility* **30**, 50-53.
- Warton, A. & Honigberg, B. M. (1979).** Structure of Trichomonads as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Protozoology* **26**, 56-62.
- World Health Organisation (2001)** Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Diseases: Overview and Estimates, WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10
- Williams, K., Lowe, P. N. & Leadlay, P. F. (1987).** Purification and characterization of pyruvate - ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Biochemical Journal* **246**, 529-536.
- Wisdom, A. R. & Dunlop, E. M. C. (1965).** Trichomoniasis - study of disease and its treatment. *British Journal of Venereal Diseases* **41**, 90-&.
- Yagi, T., Kimura, K. & Inokuchi, H. (1985).** Analysis of the active center of hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki by magnetic measurements. *Journal of Biochemistry* **97**, 181-187.

Yarlett, N., Coleman, G. S., Williams, A. G. & Lloyd, D. (1984). Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. *Fems Microbiology Letters* **21**, 15-19.

Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D. & Williams, A. (1981). Hydrogenosomes in the rumen protozoan *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochemical Journal* **200**, 365-&.

Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D. & Williams, A. G. (1983). Hydrogenosomes in a mixed isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from ovine rumen contents. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **74**, 357-364.

Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C. & Greenwood, C. A. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemical Journal* **236**, 729-739.

Zhang, Z. F. & Begg, C. B. (1994). Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia - Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology* **23**, 682-690.

Zhao, T., Cruz, F. & Ferry, J. G. (2001). Iron-sulfur flavoprotein (Isf) from *Methanosarcina thermophila* is the prototype of a widely distributed family. *Journal of Bacteriology* **183**, 6225-6233.

Zinder, S. H., Sowers, K. R. & Ferry, J. G. (1985). *Methanosarcina thermophila* Sp-Nov, a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 522-523.