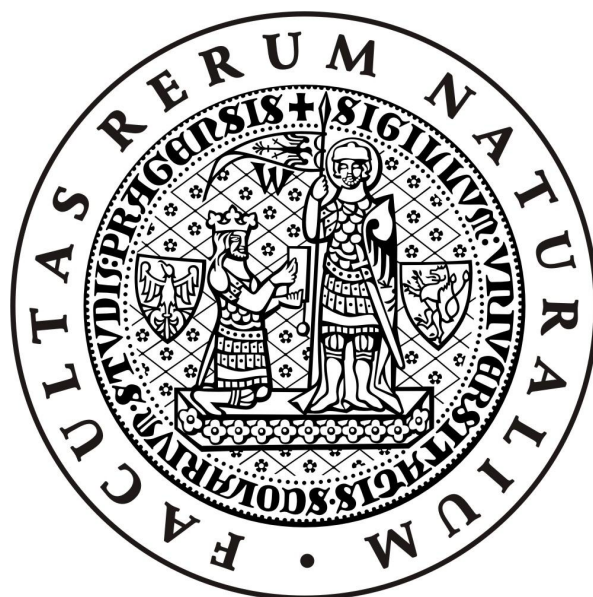


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Parazitologie



Vra Zedníková

Homology pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy  
z hydrogenosom *Trichomonas vaginalis*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlá-uji, že jsem zadanou diplomovou práci vypracovala sama a že jsem uvedla ve-keré použité informa ní zdroje. Souhlasím s p ípadným zap j ováním práce.

í í í í í í í í í í í í í í .

Chtěla bych tímto od srdce poděkovat za veškerou kritiku, pomoc a rady mému školiteli Ivanu Hrdému, díky kterému, pevně doufám, vznikla dobrá práce. Nemalý děk patří také Evě Nývltové, Honzovi Pyřihovi a Honzovi Machovi, kteří mi mnohokrát poradili, a všem kolegům a kamarádům z parazitologie i mimo laboratoř, protože často dokázali nadlehnout této těžké situaci a práce ubíhala veseleji. Nejde zapomenout ani na naši Míšu, její trpělivost s námi všemi a ochotu s nímkoli poradit. Velký děk patří samozřejmě také rodičům, kteří mě neustále podporují a vytvářejí pohodové zázemí, a to nejen pro studium. A nesmím zapomenout ani na Petra, jehož smysl pro humor, pohled na svět, podpora a otevřenost jsou pro mě bezesporu kořením života.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1 Úvod.....   | 7  |
| 2 Literární přehled .....   | 8  |
| 2.1 Klíčové enzymy metabolizující pyruvát u vybraných organismů .....                   | 8  |
| 2.1.1 Pyruvát dehydrogenázový komplex.....  | 8  |
| 2.1.2 Pyruvát:formát lyáza .....  | 9  |
| 2.1.3 Pyruvát:NADP <sup>+</sup> oxidoreduktáza.....                                     | 11 |
| 2.1.4 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza.....  | 12 |
| 2.2 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....  | 13 |
| 2.2.1 Energetický metabolismus <i>T. vaginalis</i> v cytosolu .....                     | 14 |
| 2.2.2 Hydrogenosomy.....  | 15 |
| 2.2.2.1 Metabolismus hydrogenosom trichomonád .....                                     | 17 |
| 2.2.2.2 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza <i>Trichomonas vaginalis</i> .....            | 20 |
| 2.3 Trichomonády a metronidazol .....   | 23 |
| 2.3.1 Aktivace metronidazolu .....  | 23 |
| 2.3.1.1 Klasická dráha aktivace metronidazolu .....                                     | 24 |
| 2.3.1.2 Alternativní dráha aktivace metronidazolu .....                                 | 25 |
| 2.3.2 Rezistence <i>Trichomonas vaginalis</i> k metronidazolu .....                     | 26 |
| 2.3.3 Aktivace a rezistence k metronidazolu u <i>T. vaginalis</i> – nový pohled .....   | 27 |
| 2.4 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs) u <i>Trichomonas vaginalis</i> ..... | 31 |
| 3 Cíle práce.....   | 32 |
| 4 Materiál a metody .....   | 33 |
| 4.1 Buněné kultury .....  | 33 |
| 4.1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....  | 33 |
| 4.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....   | 34 |
| 4.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 34 |
| 4.2 Kultivační média .....  | 34 |
| 4.3 Poufleté techniky .....   | 36 |
| 4.3.1 Amplifikace genů .....  | 36 |
| 4.3.2 Poufleté plasmidy.....  | 38 |
| 4.3.2.1. Expresní plasmid pET-42b+.....   | 38 |
| 4.3.2.2 Expresní plasmid pYM-N23 .....  | 40 |
| 4.3.2.3 Expresní plasmid TagVag .....   | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3.3 Klonování <i>pfod</i> do pET-42b+.....   | 42 |
| 4.3.3.1 Test exprese PFOD .....  | 43 |
| 4.3.3.2 Nativní purifikace PFOD .....  | 43 |
| 4.3.3.3 Stanovení molekulové hmotnosti PFOD.....   | 44 |
| 4.3.4 Příprava rekombinantního proteinu na protilátku proti PFOD.....                              | 45 |
| 4.3.4.1 Exprese proteinu .....   | 45 |
| 4.3.5 Klonování <i>pfod</i> do kvasinkového vektoru pYM-N23 .....                                  | 46 |
| 4.3.5.1 Transformace kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                                | 46 |
| 4.3.5.2 Test exprese PFOD v kvasinkách.....  | 47 |
| 4.3.6 Amplifikace a klonování <i>pfod</i> do vektoru TagVag .....                                  | 47 |
| 4.3.7 Elektroporace trichomonád .....  | 48 |
| 4.3.7.1 Kmen T1.....   | 48 |
| 4.3.7.2 Kmen Tv 10-02 MR 100.....  | 48 |
| 4.3.8 Frakcionace trichomonád .....  | 49 |
| 4.3.9 Detekce proteinů pomocí Western blottingu.....   | 50 |
| 4.3.10 Detekce PFOD pomocí imunofluorescencí.....  | 51 |
| 4.4 Kvantitativní Real Time PCR.....   | 52 |
| 4.4.1 Izolace RNA pomocí Trizolu Reagent.....  | 52 |
| 4.4.2 Purifikace RNA pomocí DnaseI (Rnase free, Fermentas).....                                    | 52 |
| 4.4.3 Syntéza cDNA (Invitrogen).....   | 53 |
| 4.5 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs).....  | 55 |
| 4.5.1 Purifikace hydrogenosomů z rezistentních trichomonád .....                                   | 55 |
| 4.5.2 Solubilizace trichomonád a hydrogenosomů pro detekci KORs.....                               | 56 |
| 4.5.3 Měření enzymatických aktivit .....   | 57 |
| 4.6.3.1 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO).....   | 57 |
| 4.6.3.2 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza D (PFOD).....  | 57 |
| 4.6.3.3 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs) .....                                       | 58 |
| 4.6.3.4 Malic enzym.....   | 58 |
| 5 Výsledky.....  | 59 |
| 5.1 Exprese PFOD v <i>E. coli</i> .....  | 59 |
| 5.1.1 Purifikace PFOD.....   | 60 |
| 5.1.2 Rekombinantní PFOD obsahuje Fe-S skupiny.....  | 61 |
| 5.1.3 Rekombinantní PFOD neredukuje methyl viologen na úroveň vybraných elektronových donorů ..... | 62 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1.4 Stanovení nativní molekulové hmotnosti PFOD .....  | 62 |
| 5.2 Exprese rekombinantní PFOD v <i>S. cerevisiae</i> .....  | 65 |
| 5.3 Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu specifické protilátky .....                               | 65 |
| 5.3.1 Testování protilátky .....   | 67 |
| 5.4 Lokalizace PFOD v <i>T. vaginalis</i> .....  | 68 |
| 5.4.1 Lokalizace rekombinantní PFOD v buňkách <i>T. vaginalis</i> pomocí nepřímé<br>imunofluorescence..... | 69 |
| 5.5 Transformace a kultivace <i>T. vaginalis</i> kmene Tv 10-02 MR 100 .....                               | 71 |
| 5.6 Kvantitativní Real Time PCR .....  | 72 |
| 5.6.1 Lokalizace dominantně exprimovaných PFO v hydrogenosomech trichomonád .....                          | 75 |
| 5.7 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy v <i>Trichomonas vaginalis</i> .....                           | 76 |
| 6 Diskuze.....   | 79 |
| 7 Závěr .....  | 85 |
| 8 Seznam použité literatury .....  | 86 |
| 9 Příloha .....  | 96 |

# 1 Úvod

Oxidativní dekarboxylace pyruvátu je důležitá reakce v metabolismu organismů vedoucí ke konzervaci energie. U většiny eukaryotních organismů a také u některých bakterií je oxidativní dekarboxylace pyruvátu prováděna pomocí multienzymového komplexu pyruvát dehydrogenázy (PDH), jehož molekulová hmotnost přesahuje 1 MDa (Wieland, 1983; Pieulle *et al.*, 1997). Tento komplex, nacházející se u eukaryot v mitochondriích, je složen z mnoha komponent, z nichž hlavní složky tvoří tři enzymy: pyruvát dehydrogenáza, dihydrolipoyl dehydrogenáza a dihydrolipoyl transacetyláza. Mimo to jsou součástí komplexu i další podstatné a regulační proteiny a pro funkci PDH je vyžadováno pět kofaktorů: tiamin pyrofosfát (TPP), lipoát, koenzym A (CoA), flavin adenin dinukleotid (FAD) a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>). Reakce katalyzovaná pomocí PDH je ireverzibilní a konečné produkty jsou acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> a NADH + H<sup>+</sup>.

Enzym zprostředkující oxidativní dekarboxylaci pyruvátu u některých anaerobních i mikroaerofilních eukaryotních a prokaryotních organismů se nazývá pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), neboli pyruvát syntáza (Yoon *et al.*, 1997). Lokalizace tohoto enzymu je závislá na kompartmentalizaci energetického metabolismu daného organismu. Buď se jedná o protein cytoplasmický, často asociovaný s cytoplasmatickou membránou, nebo je PFO lokalizovaná v organelle mitochondriálního typu. Nově se rovněž ukazuje, že u některých anaerobních eukaryot mohou být paralogy PFO lokalizovány v obou kompartmentech (*Mastigamoeba balamuthi*, Nývltová *et al.*, rukopis v přípravě). PFO obsahuje železo-sírné skupiny, včetně TPP, ale nikoli flavin ani lipoát. V reakci katalyzované pomocí PFO vznikají z pyruvátu a CoA produkty acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> a uvolní se dva elektrony. Tyto elektrony předává PFO nízkomolekulárním proteinovým partnerům, které mají více negativní redoxní potenciál než NAD<sup>+</sup>. Ve většině případů jsou tyto partnery ferredoxiny (Williams *et al.*, 1987), například flavodoxiny jako je tomu u bakterií fixujících dusík (Brostedt and Nordlund, 1991). Na rozdíl od PDH je reakce katalyzovaná pomocí PFO reverzibilní.

PFO vlastní také trichomonády, prvoci s organelami mitochondriálního typu, hydrogenosomy (Müller, 1993). A právě PFO je jeden z klíčových enzymů v metabolismu hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis*. V genomu *T. vaginalis* bylo identifikováno celkem sedm PFO genů (Carlton *et al.*, 2007), které byly pojmenovány PFO A, B1, B2, C, D, E a F. PFO D má ze všech paralogů PFO v *T. vaginalis* nejdelší a zároveň nejdelší nukleotidovou sekvenci.

Právě tato odlišnost nás vedla k podrobnějšímu zkoumání proteinu PFO D a snažíme se zjistit jeho funkci, aktivitu a míru exprese v buňkách *Trichomonas vaginalis*.

## 2 Literární přehled

Literární přehled byl částečně převzat z mé bakalářské práce, doplněn o nejnovější poznatky a dále rozšířen.

### 2.1 Klíčové enzymy metabolizující pyruvát u vybraných organismů

V této kapitole stručně shrnuji enzymy metabolizující pyruvát (pyruvát dehydrogenázový komplex, pyruvát:formát lyázu a pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu) eukaryotních organismů vlastních hydrogenosomy. Dále charakterizuji pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu eubakterie *Desulfovibrio africanus* a pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktázu (PNO) organismů *Euglena gracilis* a *Cryptosporidium parvum*. Využiji se také enzymů metabolizujících pyruvát u organismu *Blastocystis hominis*. Trichomonádám, jejich hydrogenosomálním metabolismu a pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáze se využiji podrobněji v samostatné podkapitole.

#### 2.1.1 Pyruvát dehydrogenázový komplex

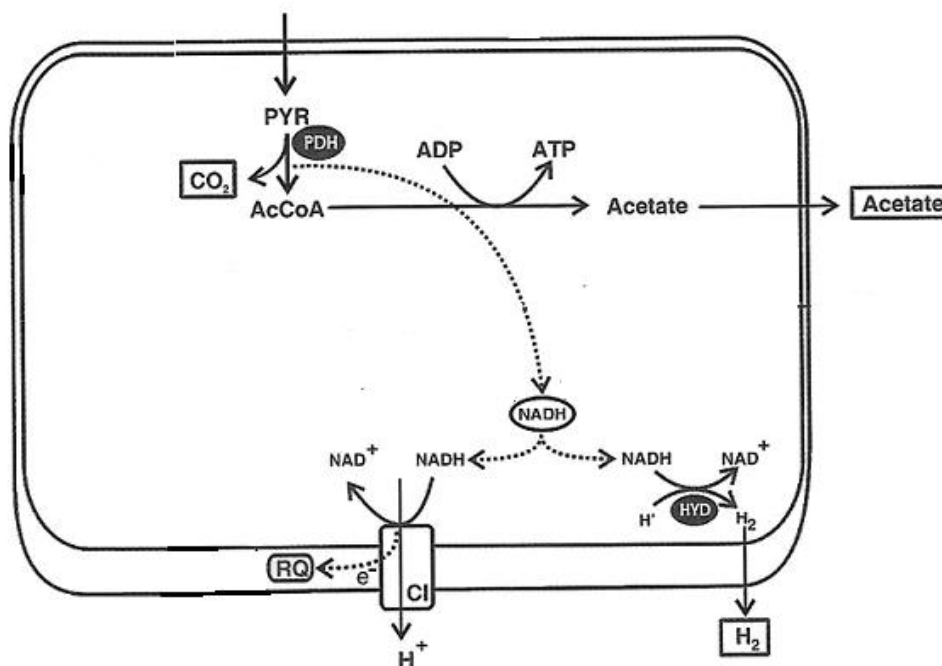
U většiny eukaryotních organismů je oxidativní dekarboxylace pyruvátu prováděna pomocí multienzymového komplexu pyruvát dehydrogenázy (PDH). PDH je multienzymový komplex, který je složen ze tří enzymů - pyruvát dehydrogenázy, dihydrolipoyl dehydrogenázy a dihydrolipoyl transacetylázy, a pěti kofaktorů: tiamin pyrofosfátu (TPP), lipoátu, koenzymu A, FAD a NAD<sup>+</sup>. PDH katalyzuje ireverzibilní dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA. Reakční mechanismus PDH spočívá ve třech po sobě jdoucích krocích dekarboxylaci pyruvátu, oxidaci keto skupiny na karboxy skupinu a navázání koenzymu A, při němž je zapotřebí úasti všech tří enzymů a pěti kofaktorů.

PDH najdeme u aerobních nálevníků vlastních mitochondrie, ale také u některých anaerobních nálevníků obsahujících hydrogenosomy (Finlay and Fenchel, 1989; Müller, 1993; Hackstein *et al.*, 1999). Mezi tyto organismy patří například *Nyctotherus ovalis*, nálevník žijící v zadním střevě včel. *N. ovalis* využívá s největší pravděpodobností k produkci acetátu pyruvát dehydrogenázový komplex (obr. 1), protože u něj byly identifikovány všechny



3 podjednotky PDH, o kterých bylo i zjištěno, že jsou exprimovány, a nebyly objeveny žádné geny pro PFO ani PFL (Boxma *et al.*, 2005).

*N. ovalis* je zajímavý mimo jiné i proto, že byl v jeho hydrogenosomech objeven genom (Akhmanova *et al.*, 1998; Boxma *et al.*, 2005).



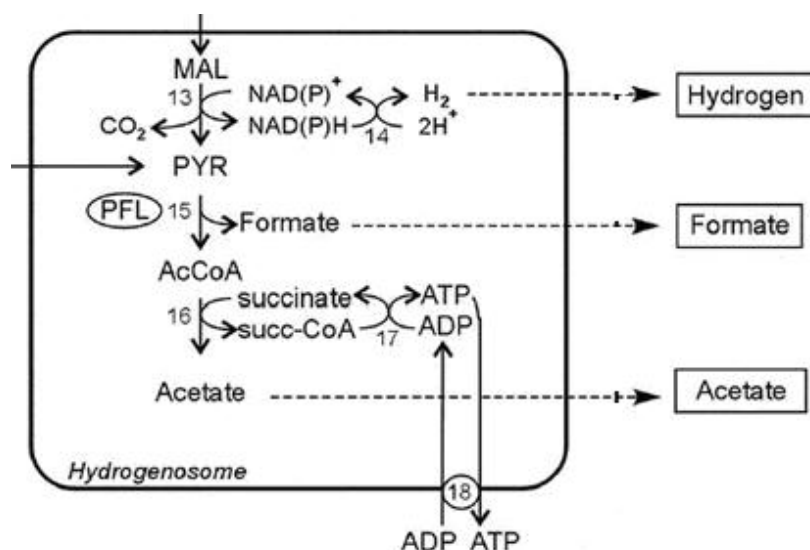
**Obr. 1: Předpokládané schéma hydrogenosomální dráhy metabolismu pyruvátu u *Nyctotherus ovalis* (převzato ze Steinbüchel and Tachezy, 2008). Vysvětlivky: AcCoA, acetyl-CoA; Hyd, hydrogenáza; CI, komplex I; RQ, rhodochinon; PYR, pyruvát; PDH, pyruvát dehydrogenáza. Konečné produkty jsou vodík, acetat a CO<sub>2</sub>.**

### 2.1.2 Pyruvát:formát lyáza

Enzym zprostředkující oxidativní dekarboxylaci pyruvátu v hydrogenosomech chytridiomycetních hub (např. *Piromyces* sp. E2 i *Neocallimastix frontalis*) (Yarlett *et al.*, 1986a; Gijzen *et al.*, 1991) a na kterých anaerobních nálevníků (např. *Trimyema compressum*) (Goosen *et al.*, 1990) se nazývá pyruvát:formát lyáza (PFL). Z pyruvátu vznikají v reakci katalyzované pomocí PFL acetyl-CoA a formát (kyselina mravenčí) a neuvolují se žádné redukční ekvivalenty jako je tomu u PFO a PDH (Akhmanova *et al.*, 1999; Boxma *et al.*, 2004).

PFL je homodimerní enzym, p i emfl jedna podjednotka tohoto enzymu má molekulovou hmotnost 85 kDa (Gelius-Dietrich and Henze, 2004). Pro katalytický mechanismus PFL je nezbytný glycylový radikál, dva konzervované cysteiny a aktiva ní protein (Becker *at al.*, 1999; Gelius-Dietrich and Henze, 2004). Tento enzym je velmi citlivý ke kyslíku, p i kontaktu s kyslíkem se enzym okamžitě rozpadá (Gauld and Ericsson, 2000). PFL vlastní mnoho anaerobních bakterií. U eukaryotních organism byla PFL doposud nalezena pouze u anaerobních chytridiomycet (nap . *Neocallimastix*), chlorofyt (nap . *Chlamydomonas*) (Gelius-Dietrich and Henze, 2004) a v cytosolu *Mastigamoeba balamuthi* (Eva Nývltová, Katedra Parazitologie, Karlova univerzita, osobní sd lení)

Tento enzym byl detekován jak v hydrogenosomech (obr. 2), tak v cytoplasm chytridiomycet (Hackstein *et al.*, 1999). V rozporu s tímto tvrzením je experiment, ve kterém byla nam ěna nízká aktivita PFO u *Neocallimastix* sp. L2 a *N. patriciarum* (Yarlett *et al.*, 1986a; O'Fallon *et al.*, 1991). Nicmén ě pozorování údajné aktivity PFO nebylo nikdy podloženo charakterizací enzymu i identifikací PFO genu v t chto organismech, tudífl by se tato skute nost musela více p ezkoumat (Hackstein *et al.*, 1999). P esto není PFO sv tu hub úpln ěizí. Kvasinky rodu *Saccharomyces*, ale i jiné druhy obsahují sulfit reductázu, enzym nezbytný pro biosyntézu metioninu, cofl jsou v podstat ě fúzní proteiny tvo ěné doménou homologní s amino-terminálním fragmentem PFO a fragmenty redoxních enzym ě (Horner *et al.*, 1999).

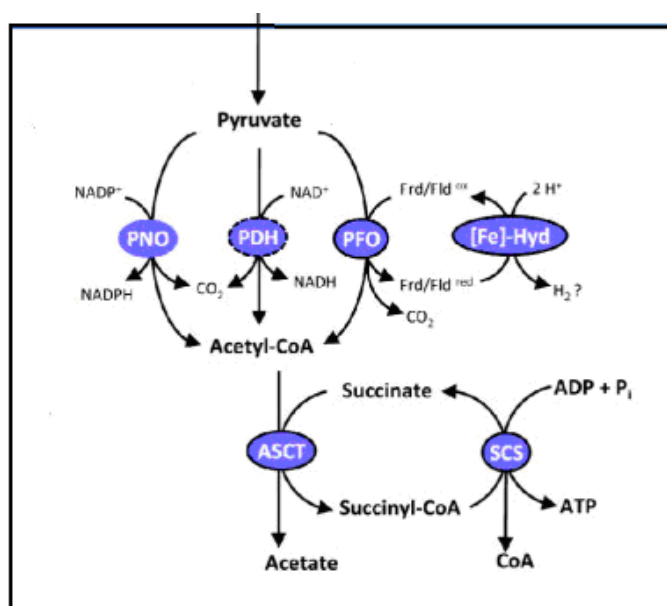


**Obr. 2: Hypotetické schéma metabolismu pyruvátu a malátu v hydrogenosomu *Piromyces* sp. E2.** (Akhmanova *et al.*, 1999). *Vysv tlivky:* 13, malic enzym; 14, hydrogenáza; 15, PFL, pyruvát:formát lyáza; 16, acetát:sukcinát CoA-transferáza; 17, sukcinyl-CoA syntetáza; 18, ADP/ATP p ěna-ě . Kone ěné produkty jsou vodík, formát, CO<sub>2</sub> a acetát.

### 2.1.3 Pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza

Enzym zprostředkující oxidativní dekarboxylaci pyruvátu u organismu *Cryptosporidium parvum* (Rotte *et al.*, 2001) a *Euglena gracilis* (Inui *et al.*, 1987; Nakazawa *et al.*, 2000) se nazývá pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza (PNO). PNO *C. parvum* je složen ze dvou sfúzovaných domén, N-terminální pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO) a C-terminální NADPH-cytochrom P450 oxidoreduktázy (CPR). Na rozdíl od mitochondriální PFO-CPR identifikované u *E. gracilis*, CpPNO neobsahuje N-terminální mitochondriální importní sekvenci (Trnáčtá *et al.*, 2006). O PNO *C. parvum* bylo zjištěno, že je lokalizovaná jak v cytosolu tohoto organismu, tak v tzv. krystaloidních tělíčkách, která jsou asociovaná s reliktní mitochondrií. Enzym PNO byl nalezen také v genomu stramenopilního moškového organismu *Thalassiosira pseudonana* (Trnáčtá *et al.*, 2006).

Zajímavá situace je u organismu *Blastocystis hominis*. Z genomové analýzy a enzymatických měření se soudí, že tento stramenopilní, anaerobní parazit loví ka vyuffívá v metabolismu pyruvátu enzymy PDH, PNO a vedou se diskuze také o PFO (obr. 3) (Lantsman *et al.*, 2008; Denoëud *et al.*, 2011).



**Obr. 3: Spekulative schéma metabolismu pyruvátu v redukované formě mitochondrie *Blastocystis hominis*** (Denoëud *et al.*, 2011). *Vysvětlivky:* PDH, pyruvát dehydrogenázový komplex; PFO, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, PNO, pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza; ASCT, acetát:sukcinát CoA transferázy; SCS, sukcinát thiokináza, Hyd, hydrogenáza.

## 2.1.4 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza

Na základě subjednotkové skladby holoproteinu rozli-ujeme několik typů PFO. PFO vyskytující se u některých mezofilních organismů je v t-inou homodimerní enzym s molekulovou hmotností nativního enzymu okolo 240 kDa (Brostedt and Nordlund, 1991; Piuelle *et al.*, 1997). PFO u některých aerobních archeí jako např. *Halobacterium halobium* se vyskytuje jako heterotetramer (2<sub>2</sub>) a je tvořená dvěma podjednotkami o molekulových hmotnostech 68 a 35 kDa (Kerscher and Oesterhelt, 1981; Piuelle *et al.*, 1997). Zajímavé je, že PFO *Halobacterium halobium* obsahuje pouze jedno Fe-S centrum na dimer (Kerscher and Oesterhelt, 1981; Kletzin and Adams, 1996). PFO vyskytující se např. u bakterie *Helicobacter pylori* (Hughes *et al.*, 1995) obsahuje čtyři odlišné subjednotky o molekulových hmotnostech 45, 33, 24 a 13 kDa (Piuelle *et al.*, 1997), přičemž každá je v aktivním holoproteinu jednou. PFO nalezené u anaerobních hypertermofilních archeobakterií (např. *Pyrococcus furiosus* i *Thermotoga maritima*) se skládá ze čtyř subjednotek (α, β, γ a δ) o molekulových hmotnostech 43, 35, 23 a 12 kDa (Kletzin and Adams, 1996). Organismus *Methanococcus maripaludis* vlastní PFO, která se patrně vyskytuje jako pentamer tvořený subjednotkami o molekulových hmotnostech 47, 33, 25, 21.5 a 13 kDa (Lin *et al.*, 2003).

PFO se je jeden z klíčových enzymů hydrogenosomálního metabolismu pyruvátu anaerobního nálevníka osídlujícího gastro-intestinální trakt p efivýkavců a va natc, *Dasytricha ruminantium* (Yarlett *et al.*, 1981). Produkt reakce PFO, acetyl-CoA je následně metabolizován na acetát a je transportován do cytosolu a přeměněn na meziprodukt butyryl-CoA a dále na butyrát pomocí enzymu butyrát kinázy (Yarlett *et al.*, 1985). Tvorba butyrátu i acetátu je spojena s produkcí ATP.

PFO najdeme také u řady anaerobních bakterií, mezi které patří gram-negativní bakterie *Desulfovibrio africanus*. *D. africanus* využíává sulfátu jako konečného akceptoru elektronů. V přítomnosti sulfátu dochází k oxidaci organických substrátů jako je malát, fumarát, alanin i laktát na meziprodukt pyruvát a dále na acetát (Piuelle *et al.*, 1997).

PFO *D. africanus* je homodimer o nativní molekulové hmotnosti přibližně 256 kDa. Tento enzym obsahuje thiamin pyrofosfát (TPP) vázaný na C-konci proteinu a v blízkosti čtyř konzervovaných cysteinových zbytků. PFO *D. africanus* obsahuje tři [4Fe-4S] skupiny na subjednotku. Standardní potenciál těchto tří center je -390 mV, -515 mV a -540 mV (Piuelle *et al.*, 1995; Piuelle *et al.*, 1997). Tento enzym se od ostatních PFO odlišuje tím, že je na C-konci prodloužen o přibližně 60 aminokyselinových zbytků. V této oblasti se nacházejí dva cysteiny

(Cys -1195 a -1212), které jsou pravděpodobně podstatné pro tvorbu disulfidického mostku souvisejícího s aktivním procesem katalytické aktivity PFO (Pieulle *et al.*, 1997).

Pokusy ukázaly, že je tento enzym velmi stabilní i v přítomnosti kyslíku, narozdíl od PFO jiných anaerobních i mikroaerofilních organismů (Pieulle *et al.*, 1997). Pro tuto stabilitu jsou pravděpodobně klíčové výše uvedené cysteinové zbytky a také methionin nacházející se v proximálním [4Fe-4S] centru. Tento mechanismus ochrany enzymu je patrně adaptivní strategie bakterií redukujících sulfát vedoucí k udržení vhodných podmínek pro zachování správné funkce enzymu (Vita *et al.*, 2008).

Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza je také jeden z klíčových enzymů hydrogenosom trichomonád. V následující podkapitole se v ní podrobně *Trichomonas vaginalis*, hydrogenosomálního metabolismu a PFO.

## **2.2 *Trichomonas vaginalis***

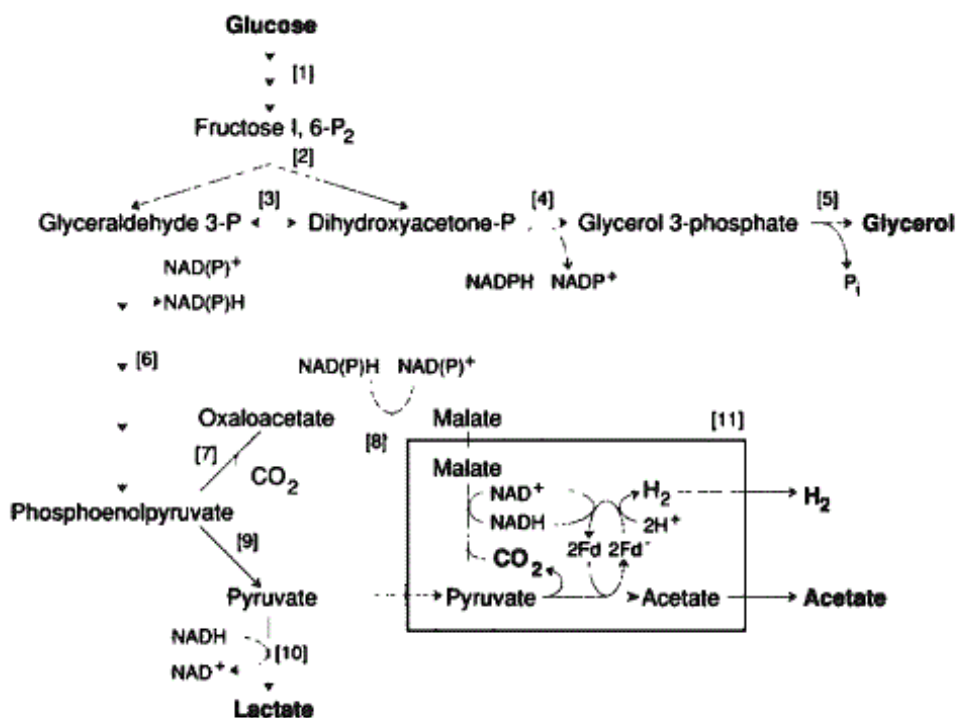
*Trichomonas vaginalis* je jednobuněčný mikroorganismus a závažný parazit urogenitálního traktu lidí. Způsobuje sexuální přenosnou onemocnění trichomoniázu, která je nejčastější infekcí nevírového původu s odhadem více než 170 milionů nových případů každým rokem (WHO, 2001). *T. vaginalis* patří do monofyletické skupiny Parabasala, která je dobře adaptovaná na anaerobní prostředí i mikroaerofilní prostředí. Buny *T. vaginalis* jsou obklopeny cytoplasmatickou membránou a jsou vybaveny 5ti bílkovými membránovými složkami tvořícími strukturami undulující membránu. Trichomonády netvoří pravé cysty, vyskytují se pouze ve stádiu trofozoitů. Buny trichomonád jsou vyztufleny cytoskeletárními strukturami axostylem, peltou a kostou (Benchimol, 2004; Carlton *et al.*, 2007). Trichomonády nevlastní typické mitochondrie ani peroxisomy a neprobíhá u nich Krebsův cyklus ani oxidativní fosforylace. Genom *T. vaginalis* byl nedávno celkově sekvencován a je veliký přibližně ~ 160 mega bází (Carlton *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Energetický metabolismus *T. vaginalis* v cytosolu

Energetický metabolismus *T. vaginalis* probíhá jak v cytoplasmu, tak v hydrogenosomech. Základní energetického metabolismu je glykolýza. Mezi hlavní glykolytické meziprodukty trichomonád patří pyruvát, který je produkovaný v cytosolu z fosfoenolpyruvátu (PEP) pomocí pyruvát kinázy (Mertens *et al.*, 1992). Další zdroj pyruvátu je cytosolický enzym NADP-specifický jablečný (malic) enzym (též malát dehydrogenáza dekarboxylující) (Doleflal *et al.*, 2004). V cytosolu *T. vaginalis* se nachází také enzym pyruvát fosfát dikináza (PPDK), která katalyzuje reverzibilní přeměnu PEP na pyruvát (Slamovits and Keeling, 2006). Druhým důležitým meziproduktem metabolismu karbohydrátů je malát, který vzniká v cytosolu trichomonád pomocí malát dehydrogenázy. Jeden z konečných produktů metabolismu karbohydrátů je laktát, produkovaný v cytosolu díky enzymu laktát dehydrogenáze, a glycerol, tvořený pomocí enzymu glycerol 3-fosfát dehydrogenázy (Chapman *et al.*, 1985) a glycerol 3-fosfatázy (Steinbüchel and Müller, 1986; Petrin *et al.*, 1998). Na obrázku 4 je zobrazena mapa karbohydrátového metabolismu *Trichomonas vaginalis*.

U *T. vaginalis* probíhá také tzv. arginin dihydrolázová dráha. V této dráze je arginin přeměněn na ornitin a dále na amoniak (pávek), přičemž se tvoří ekvimolární množství ATP. Enzymy ornitin karbamyltransferáza a karbamát kináza jsou u *T. vaginalis* lokalizované v cytosolu a enzym arginin deimináza je lokalizovaná v hydrogenosomech (Morada *et al.*, 2011) (viz str. 18).

Při analýze genomu *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007) bylo nalezeno mnoho enzymů účastnících se metabolismu aminokyselin. Byla potvrzena přítomnost aminotransferáz a glutamát dehydrogenázy. Metabolické dráhy zahrnující tyto enzymy jsou patrně katabolické, ale za určitých podmínek mohou fungovat i reverzibilně, což trichomonádám zajišťuje možnost syntetizovat glutamát, aspartát, alanin, glutamin a glycin (Carlton *et al.*, 2007). Dále byly objeveny geny kódující enzymy účastnící se metabolismu methioninu a dráhy *de novo* syntézy cysteinu zahrnující enzym cystein syntázu (Carlton *et al.*, 2007).



**Obr. 4: Mapa karbohydrátového metabolismu *Trichomonas vaginalis*** (Steinbüchel and Müller, 1986). *Vysv tlivky*: 1, enzymy formující fruktózu-1,6-bisfosfát; 2, aldoláza; 3, triosofosfát izomeráza; 4, glycerol 3-fosfát dehydrogenáza; 5, glycerol 3-fosfatáza; 6, enzymy formující fosfoenolpyruvát; 7, fosfoenolpyruvát karboxykináza; 8, malát dehydrogenáza; 9, pyruvát kináza; 10, laktát dehydrogenáza; 11, hydrogenosomální dráha pyruvátu a malátu. Kone né produkty metabolismu karbohydrát jsou laktát, glycerol, acetát, H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>.

## 2.2.2 Hydrogenosomy

Hydrogenosomy dostaly své jméno podle jednoho z kone ných produkt jejich metabolismu, vodíku (Lindmark and Müller, 1973). Tyto organely byly poprvé objeveny u trichomonád infikujících skot, *Tritrichomonas foetus* (Lindmark and Müller, 1973), a pozd ji také v lidském parazitu *Trichomonas vaginalis* (Lindmark and Müller, 1975), který se brzy stal nejvíce studovaným organismem vlastním tyto organely. Jak jíl bylo eno, hydrogenosomy mají také dal-í anaerobní i mikroaerofilní organismy, jako jsou například nálevníci i chytridiomycetní houby. Doposud v-ak nebyly hydrogenosomy objeveny v rostlinách.

V roce 2010 vy-ly publikace (Danovaro *et al.*, 2010; Mentel and Martin, 2010), které p iná-ějí nové poznatky o flivo í-ích (Metazoa), kte í by mohli vlastnit hydrogenosomy. Doposud

se předpokládalo, že se hydrogenosomy nacházejí výlučně v jednobuněčných eukaryotních organismech. Nedávno však byli objeveni živočichové jako například *Spinoloricus* i *Rugiloricus* (Loricifera), kteří osidlují hlubokomořskou anoxickou pánev L'Atalante ve Středozemním moři a kteří jsou dobře adaptováni na anaerobní podmínky. Tyto organismy nevlastní štipické mitochondrie, ale orgány morfologicky velmi podobné hydrogenosomům, které jsou asociovány s endosymbiotickými prokaryotními organismy, podobně jako je to známo u *N. ovalis*, kde jsou hydrogenosomy asociovány s metanogenními archebakteriemi (Gijzen *et al.*, 1991). Další ověření těchto výsledků je nezbytné, ale díky tomuto objevu se otevírají nové možnosti studia Metazoi osidlujících extrémních habitatů.

Od chvíle, kdy došlo k objevení hydrogenosomů, spekulují vědci o jejich původu a podobnosti s mitochondriemi. Studie těchto organel na rozličných mikroorganismech přinesly dvě možné teorie. První výklad se opírá o metabolismus hydrogenosomů a jejich dva základní enzymy – PFO a hydrogenázu, které nalezneme u fermentujících a metanogenních bakterií. Tato teorie předpokládá, že hydrogenosomy vznikly z endosymbiotické anaerobní bakterie (Whatley *et al.*, 1979; Bradley *et al.*, 1997). Jako hostitel se uvažoval amitochondriální praeukaryot (Cavalier-Smith, 1986; Cavalier-Smith, 1987). Byla předložena tzv. Archezoální hypotéza, na jejím základě byla v rámci systematického třídění organismů navržena i.e. Archezoa, kam byla zařazena souasná jednobuněčná eukaryota (diplomonády, trichomonády, mikrosporidie a archaméby), u kterých nebyla do té doby nalezena mitochondrie (Cavalier-Smith, 1986).

V poslední době však vědci přijímají teorii, že hydrogenosomy a mitochondrie jsou homologní orgány mající společného fakultativně anaerobního předka z původu proteobakterií, který se spojil s prokaryotní buňkou, ze které následně vznikly první eukaryotní organismy (Hackstein *et al.*, 2006). Tato teorie je podpořena nalezením mitochondriálních proteinů (např. chaperon Cpn60 a Hsp70 (Bui *et al.*, 1996), dvou subjednotek NADH dehydrogenázy (Hrdý *et al.*, 2004), sukcinyl CoA syntetázy (Schnarrenberger and Martin, 2002) i komponenty účastnící se tvorby železo-sírných skupin (Tachezy *et al.*, 2001)) a hydrogenosomální DNA *Nyctotherus ovalis*, která je jasně mitochondriálního původu (Akhmanova *et al.*, 1998).

Vzhledem k tomu, že byly hydrogenosomy nalezeny u zástupců evolučně vzdálených skupin anaerobních i mikroaerofilních protistů, je pravděpodobné, že vznikly v průběhu evoluce nezávisle na sobě, a to jako důsledek adaptace organismů k prostředí chudému na kyslík (Müller, 1993).



Hydrogenosomy jsou organely mající kulatý i lehce protáhlý tvar se selektivně propustnou dvojitou membránou (Benchimol and De Souza; 1983; Müller, 1993). Obsahují homogenní granulární matrix se solubilními proteiny karbohydrátového metabolismu a dalšími enzymatickými systémy (Benchimol, 1999). Tato organela může být degradována v procesu autofágie, který začíná obalením hydrogenosomu drsným endoplasmatickým retikulem a končí v lysosomech (Benchimol, 1999). Až na jednu výjimku anaerobního nálevníka *Nyctotherus ovalis* nebyla v hydrogenosomech objevena DNA (Akhmanova *et al.*, 1998).

Role hydrogenosom spočívá především v tvorbě Fe-S center, probíhá zde energetický metabolismus, na které reakce metabolismu aminokyselin a tyto organely obsahují také enzymy potřebné k odstranění nebezpečných kyslíkových radikálů.

### 2.2.2.1 Metabolismus hydrogenosom trichomonád

V hydrogenosomech trichomonád probíhá mnoho metabolických drah (obr. 5). Substráty pro katabolický metabolismus hydrogenosom pocházejí z glykolýzy probíhající v cytosolu. Pyruvát a malát jsou importovány do hydrogenosomu dosud neidentifikovanými proteiny, pyruvát je v hydrogenosomech oxidativně dekarboxylován pomocí klíčového enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy. V této reakci vzniká ekvimolární množství acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> a uvolní se dva elektrony. Tyto elektrony jsou předány na nízkomolekulární [2Fe-2S] proteinu ferredoxin, který je následně odevzdá [FeFe] hydrogenáze (Payne *et al.*, 1993). Tento enzym redukuje protony za vzniku molekulárního vodíku a zároveň dochází k reoxidaci ferredoxinu. Acetyl-CoA je dále přeměněn pomocí enzymu acetát:sukcinát-CoA transferázy (ASCT) na konečný produkt metabolismu acetát a vedlejší produkt sukcinyl-CoA (Jenkins *et al.*, 1991). Sukcinát thiokináza (STK, též sukcinyl-CoA syntetáza) přeměňuje sukcinyl-CoA na sukcinát, energie thioesterové vazby je v tomto kroku konzervována a dochází k substrátové fosforylaci ADP na ATP.

Pyruvát lze získat také z malátu v procesu reverzibilní oxidativní dekarboxylace pomocí NAD-specifického malic enzymu. V genomu trichomonád bylo objeveno 9 genů kódujících hydrogenosomální malic enzym, z nich je ve šwild type obou kácích exprimováno (Schneider *et al.*, 2011).

V hydrogenosomech trichomonád je přítomen i další enzym energetického metabolismu, a to ATP:AMP fosfotransferáza (adenylát kináza) (Declerck and Müller, 1987).

Jak již bylo řečeno, ATP si dokáží trichomonády vytvořit i v tzv. dihydrolázové dráze argininu, kdy se v hydrogenosomu nachází jeden enzym této dráhy, arginin deimináza (Yarlett *et al.*, 1994; Morada *et al.*, 2011). V genomu *T. vaginalis* byly nalezeny tři geny pro tento hydrogenosomální enzym (ADI 1-3). Trichomonády takto zejména získávají nezanedbatelné množství energie.

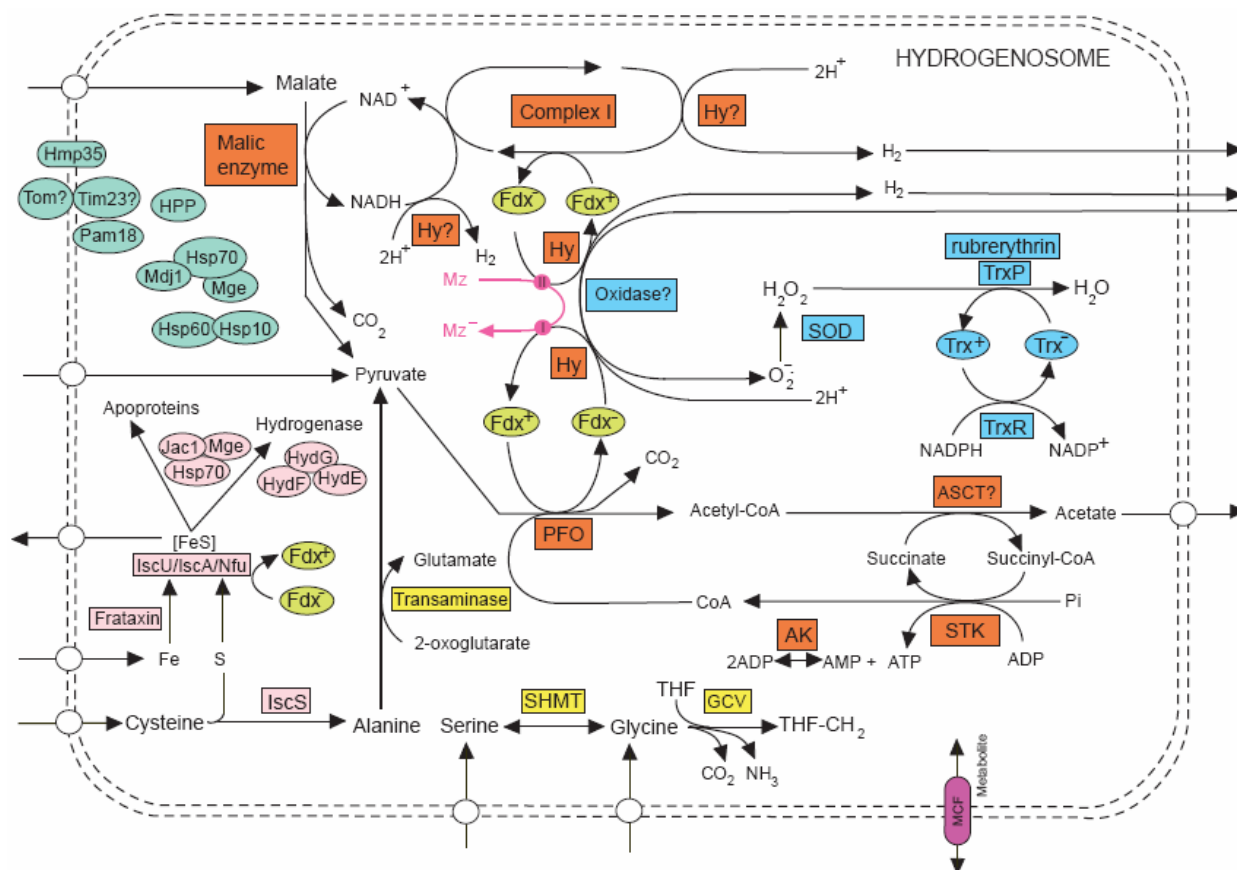
V hydrogenosomech trichomonád probíhá další velmi důležitá dráha, a to tvorba železo-sírných skupin, anorganických kofaktorů, které jsou zcela nepostradatelné pro tvorbu proteinů k jejich správné biologické funkci. Zpravidla je tento proces v buňce zprostředkován pomocí speciálního procesu syntézy Fe-S komplexů (tzv. ISC assembly). Fe-S skupiny jsou nejprve skládány na tzv. proteinovém lešení a poté přeneseny na akceptorové apoproteiny. Geny kódující všechny komponenty této machinery byly identifikovány v genomu *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007).

Při analýze genomu *T. vaginalis* byly objeveny geny kódující hydrogenosomální enzymy podstatné pro metabolismus aminokyselin. *T. vaginalis* vlastní dva z těchto proteinů glycin dekarboxylázového komplexu (GDC) (konkrétně H a L proteiny), který katalyzuje oxidativní dekarboxylaci a deaminaci glycinu, čímž vzniká CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> a NADH (Mukherjee *et al.*, 2006a). A dále byl objeven gen pro serin hydroxymethyltransferázu (SHMT) (Carlton *et al.*, 2007), dimerní pyridoxal fosfát-dependentní enzym katalyzující reverzibilní přeměnu serinu a tetrahydrofolátu (THF) na glycin a N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metylen THF (Schirch and Szebenyi, 2005, Mukherjee *et al.*, 2006b).

Relativně nedávno bylo objeveno, že hydrogenosomy trichomonád obsahují i komponenty mitochondriálního dýchacího řetězce, a to 2 podjednotky NADH dehydrogenázy (též NAH:ubichinon oxidoreduktáza, komplex I) (Hrdý *et al.*, 2004). Tento enzym je u *T. vaginalis* heterodimer, jedna podjednotka obsahuje kofaktor flavin mononukleotid (FMN) a [4Fe-4S] skupinu, druhá [2Fe-2S] skupinu. Tento enzym přenáší v hydrogenosomech elektrony z NADH na ferredoxin, a propojuje tak oxidaci NADH s produkcí vodíku přes enzym hydrogenázu (Hrdý *et al.*, 2004).

Pro trichomonády jsou též nepostradatelné antioxidantní mechanismy, které chrání klíčové hydrogenosomální enzymy před vysokými koncentracemi kyslíku. Mezi hlavní antioxidanty patří bezesporu cystein (Coombs *et al.*, 2004). Jak v cytosolu, tak v hydrogenosomech je přítomná superoxid dismutáza (SOD), která přeměňuje dvě molekuly superoxidového radikálu na peroxid vodíku a kyslík (Ellis *et al.*, 1994). Kataláza, která by odstraňovala peroxid vodíku, byla detekována pouze v *Trichomonas foetus*, nikoli u *T. vaginalis* (Page-Sharp *et al.*, 1996). Další hydrogenosomální antioxidantní enzymy mající peroxidázovou aktivitu jsou rubrerytrin a

peroxiredoxin (Putz *et al.*, 2005; Mentel *et al.*, 2008). Nedávno byl popsán dimerní tzv. flavodiiron protein (FDP) patří do superrodiny flavodiiron proteinů třídy A, váže FMN a zajišťuje redukci kyslíku na vodu (Smutná *et al.*, 2009).



**Obr. 5: Předpokládaná mapa metabolismu hydrogenosom *T. vaginalis*** (Carlton *et al.*, 2007). Oranžová barva reprezentuje enzymy energetického metabolismu (Hy, hydrogenáza; PFO, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; AK, adenylát kináza; STK, sukcinát thiokináza; ASCT, acetát sukcinát-coA transferáza). Fdx, ferredoxin (zelená barva) dodává elektrony hydrogenáze, která syntetizuje molekulární vodík. Předpokládaná aktivita proteinů, které byly odhaleny sekvenací genomu: fialová – tvorba Fe-S center a maturace hydrogenázy (HydG, HydF, HydE, pomocné maturázy Fe hydrogenázy; Jac1 a Mdj1, chaperony obsahující J doménu; Mge, nukleotid exchange faktor; HPP, hydrogenosomální procesující peptidáza); modrá – antioxidantní mechanismy (SOD, superoxid dismutáza; Trx, thioredoxin; TrxP, thioredoxin peroxidáza; TrxR, thioredoxin reduktáza); fialová – metabolismus aminokyselin (GCV, glycin dekarboxylázový komplex; SHMT, serin hydroxymetyl transferáza); světle modrá – translokace proteinů přes membrány hydrogenosomu a jejich maturace.

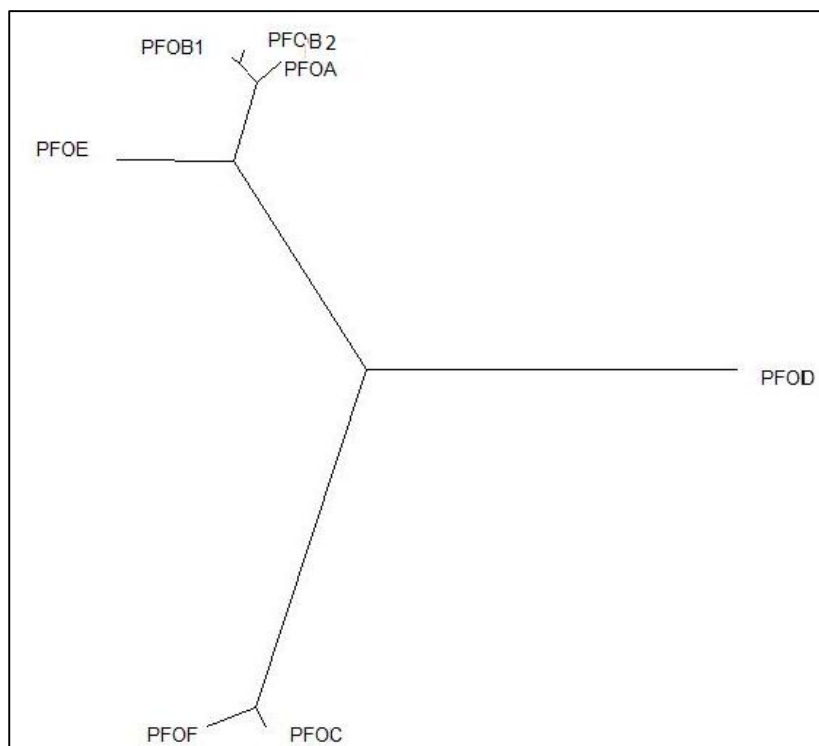
### 2.2.2.2 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza *Trichomonas vaginalis*

Jak již bylo řečeno, jeden z klíčových enzymů energetického metabolismu hydrogenosom *Trichomonas vaginalis* je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (neboli pyruvát syntáza). Tento felezo-sirný protein patří do třídy enzymů oxidoreduktáz a katalyzuje reverzibilní CoA dependentní oxidativní dekarboxylaci pyruvátu za vzniku ekvimolárního množství acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> a dvou elektronů. V roce 1987 vyšla publikace (Williams *et al.*, 1987), ve které byla popsána enzymatická aktivita PFO také s 2-oxobutyrátem a 2-oxoglutarátem. PFO však nedokázala využít NAD<sup>+</sup> ani NADP<sup>+</sup>.

PFO je protein asociovaný s vnitřní hydrogenosomální membránou a značně citlivý na přítomnost kyslíku. Ten poškozuje Fe-S centra proteinu oxidací feleza, což vede k nestabilitě a rozpadu enzymu (Lindmark and Müller, 1973; Outten, 2007). PFO je dimerní protein obsahující patrně i [4Fe-4S] centra (avšak přesný počet zatím nebyl stanoven) a nekovalentně vázaný thiamin pyrofosfát. Nativní molekulová hmotnost tohoto enzymu je přibližně 240 kDa (Williams *et al.*, 1987).

Preprotein PFO je na N-konci delší o několik aminokyselin nežl maturovaný enzym (Hrdý and Müller, 1995a). Tento pentapeptid se nazývá hydrogenosomální importní (targeting) sekvence a je nezbytná k translokaci preproteinu do organely. Po importu je odštěpena specifickou hydrogenosomální peptidázou (Maid *et al.*, 2008). Typická délka hydrogenosomálních importních sekvencí je cca 9-12 aminokyselin, avšak u PFO, kde je importní sekvence extrémně krátká (Hrdý and Müller, 1995a), a několika dalších hydrogenosomálních proteinů se o nezbytnosti této sekvence diskutuje a zvažuje se i nutnost přítomnosti zatím neidentifikovaného konformačního i interního importního signálu (Mentel *et al.*, 2008; Burstein *et al.*, 2012).

V genomu *T. vaginalis* bylo identifikováno celkem 7 paralogů PFO (A, B1, B2, C, D, E, F, přičemž patrně všechny jsou šwild type obou kách exprimovány (Schneider *et al.*, 2011, Jedelský *et al.*, osobní komunikace). Porovnáním všech sedmi sekvencí máme rozdělít tyto paralogy do 2 skupin (1) PFO A, B1 a B2, (2) PFO C, E, F a pokud zvlášť stojí PFO D, která má ze všech nejdelší sekvenci a je nejméně konzervativní (obr. 6) (Carlton *et al.*, 2007).



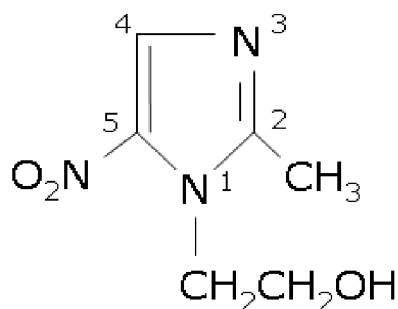
**Obr. 6: Fylogram paralog PFO A-F ukazující stupeň jejich podobnosti.** Fylogram byl vytvořen na základě sekvencí PFO v programu TreeView. Z obrázku je zřejmé, že PFOD je ze všech paralogů nejdivergentnější.

PFO využívá TPP, koenzymu A a [4Fe-4S] center k oxidativní dekarboxylaci pyruvátu. Při reakci katalyzované pomocí PFO se vytvoří adukt TPP s pyruvátem. Pyruvát je následně dekarboxylován za vzniku hydroxyethyl-tiamin pyrofosátového (HE-TPP) radikálu a  $\text{CO}_2$  (Docampo *et al.*, 1987; Furdui and Ragsdale, 2002). Dále dochází k přenesení elektronu z HE-TPP radikálu na [4Fe-4S] skupinu. Koenzym A patrně zvyšuje rychlost této reakce, při němž bylo navrženo několik mechanismů vedoucích ke vzniku acetyl-CoA (Furdui and Ragsdale, 2002). U bakterie *Halobacterium halobium* bylo také zjištěno, že bezprostředně po oxidativní dekarboxylaci pyruvátu dochází k tvorbě stabilního volného radikálu, při němž uvolněné elektrony jsou přeneseny na Fe-S centra enzymu a dále na ferredoxin (Kerscher and Oesterhelt, 1981; Docampo *et al.*, 1987). V hydrogenosomech *Tritrichomonas foetus* byly detekovány tzv. thiolové radikály, které pravděpodobně vznikají při přenesení elektronu z koenzymu A na [4Fe-4S] centrum a následně se slučují s HE-TPP radikálem (Furdui and Ragsdale, 2002). Tomuto mechanismu se říká tzv. biradikálový.

PFO *T. vaginalis* je velmi důležitý enzym, i co se lékařského významu týče. PFO je dle všeobecně přijímaného konceptu jeden z klíčových enzymů vystupujících při aktivaci antimikrobiálních léčiv proti trichomoniáze 5-nitroimidazol, mezi které patří i metronidazol. Toto léčivo je v hydrogenosomu redukováno na cytotoxickou formu pomocí enzymatického systému sestávajícího z redoxně aktivních proteinů přenášejících elektrony s nízkým redoxním potenciálem. Vznikají vysoce reaktivní radikály způsobující buněčnou smrt. Hodnoty redoxních potenciálů nejvýznamnějších donorů elektronů u aerobních a anaerobních organismů se velmi liší, proto je metronidazol vysoce selektivní a efektivní proti anaerobům (viz kapitola trichomonády a metronidazol).

## 2.3 Trichomonády a metronidazol

K léčbě trichomoniázy, sexuálně přenosného onemocnění lidí, se používají různé deriváty 5-nitroimidazol, sloučenin s pětiletým kruhem se dvěma dusíky a s nitroskupinou ( $\text{NO}_2^-$ ) na pátém atomu kruhu. Mezi nitroimidazoly patří také metronidazol (obr. 7), který byl do klinické praxe zaveden před více než 50ti lety a používá se úspěšně dodnes.



Obr. 7: 1-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-5-nitroimidazol (metronidazol).

### 2.3.1 Aktivace metronidazolu

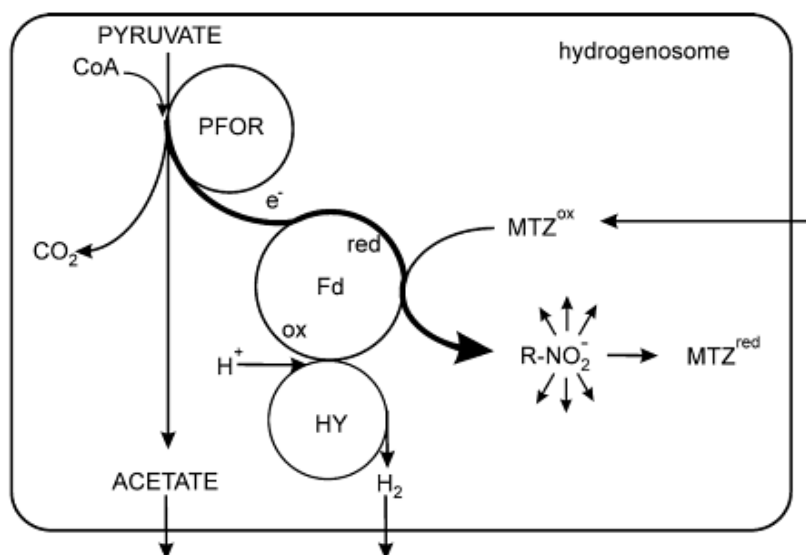
Metronidazol vstupuje do buněk trichomonád pasivní difúzí (Müller and Lindmark, 1976) a akumuluje se dle všeobecně uznávaného konceptu v hydrogenosomu, kde probíhá také jeho aktivace. V hydrogenosomu dochází k dekarboxylaci pyruvátu, respektive malátu k uvolnění elektronů, které jsou za normálních okolností předány přes nízkomolekulární přenašeče ferredoxiny enzymu hydrogenáze, a dochází k tvorbě molekulárního vodíku. V přítomnosti metronidazolu jsou však tyto elektrony předávány právě tomuto léku, které je redukováno za vzniku velmi reaktivních cytotoxických metabolitů, pravděpodobně nitroradikálových aniontů (Edwards, 1993a). Tyto produkty patrně poškozují DNA, proteiny a lipidy, což vede ke smrti organismu (Kulda, 1999).

Metronidazol je vysoce selektivní a efektivní proti anaerobním organismům. Tyto anaerobové mají redoxní reakce závislé na proteinech s nízkými hodnotami redoxpotenciálu než aerobní organismy. Nitroskupina metronidazolu má redoxní potenciál  $-486$  mV. Redoxpotenciály donorů elektronů aerobů jsou pozitivnější než u nitroimidazolu. Metronidazol je proto vysoce účinným akceptorem elektronů a působí selektivně na buňky flující v anaerobním i mikroaerofilním prostředí (Kulda, 1999).

V hydrogenosomu byly popsány dva způsoby, jakými je metronidazol aktivován. Jde o tzv. klasickou a alternativní dráhu aktivace metronidazolu.

### 2.3.1.1 Klasická dráha aktivace metronidazolu

Po dekarboxylaci pyruvátu pomocí enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy v hydrogenosomu jsou elektrony transportovány na nízkomolekulární p ena-e e ferredoxiny, které je ovšem v přítomnosti metronidazolu nepředávají enzymu hydrogenáze, ale právě metronidazolu, který vystupuje jako vysoce afinitní akceptor elektronů. Redukcí metronidazolu vznikají reaktivní aniontové radikály ( $R\text{-NO}_2^-$ ) pokračující buď k (obr. 8). Tvorba vodíku je následně potlačena (Lloyd and Kristensen, 1985; Kulda, 1999).

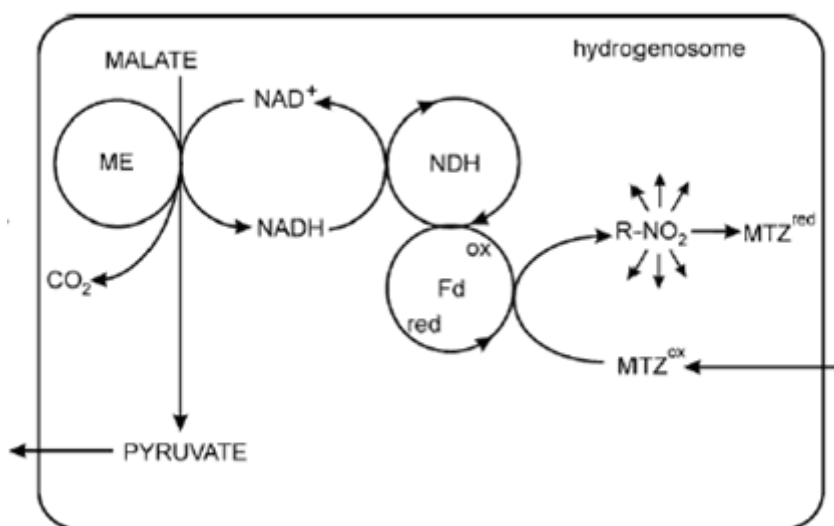


**Obr. 8: Schématická mapa aktivace metronidazolu v hydrogenosomu o klasická dráha** (Kulda, 2007). *Vysvětlivky:* PFOR, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; Fd, ferredoxin; MTZ, metronidazol; HY, hydrogenáza



### 2.3.1.2 Alternativní dráha aktivace metronidazolu

Tato dráha je u *Trichomonas vaginalis* nezávislá na aktivitě enzymu PFO (obr. 9). Elektrony potřebné pro redukci metronidazolu jsou generovány v procesu oxidativní dekarboxylace malátu pomocí hydrogenosomálního malic enzymu za vzniku pyruvátu,  $\text{CO}_2$  a uvolnění 2 elektronů. Tyto elektrony redukují  $\text{NAD}^+$  na NADH a jsou dále předány přes enzym NADH dehydrogenázu (neboli NADH:ferredoxin oxidoreduktázu, homolog 2 subjednotek komplexu I) na ferredoxin a následně na metronidazol (Hrdý *et al.*, 2005).



**Obr. 9:** Schématická mapa aktivace metronidazolu v hydrogenosomu a alternativní dráha (Kulda, 2007). Vysvětlivky: ME, malic enzym; Fd, ferredoxin; MTZ, metronidazol; NDH, NADH dehydrogenáza.

### 2.3.2 Rezistence *Trichomonas vaginalis* k metronidazolu

Již několik let po první aplikaci metronidazolu proti trichomoniáze byl pozorován vznik rezistence u *Trichomonas vaginalis* k tomuto léku (Edwards, 1993b). Rezistenci k metronidazolu lze u *T. vaginalis* navodit také *in vitro*, a to při dlouhotrvající kultivaci v médiu se subletální koncentrací metronidazolu, při které dochází k podstatným metabolickým změnám v cytosolu a v hydrogenosomech trichomonád.

U trichomonád rozeznáváme dle všeobecně přijímaného konceptu dva typy rezistence, tzv. aerobní a anaerobní, v závislosti na podmínkách, které jsou pro jejich vznik a manifestaci důležité (Kulda, 1993). Aerobní rezistence se projevuje za přítomnosti kyslíku (Meingassner *et al.*, 1987; Kulda 1999) a pouze tento typ rezistence byl doposud pozorovaný u klinických izolátů. Dochází pravděpodobně ke zhoršenému odstranění kyslíku buňkou (Yarlett *et al.*, 1986; Rasoloson *et al.*, 2001; Cudmore *et al.*, 2004) a následně zvýšená koncentrace intracelulárního kyslíku může bránit aktivaci metronidazolu. Mechanismus tohoto děje spoívá buď v kompetici o elektrony, kdy je kyslík silnějším akceptorem elektronů, popřípadě v re-oxidaci nitro radikálů (Kulda, 1999). V aerobně rezistentních buňkách byla zjištěna snížená aktivita hydrogenosomálních enzymů PFO, dále NADH:ferredoxin oxidoreduktázy a malic enzymu (Rasoloson *et al.*, 2002).

U buněk kultivovaných *in vitro* v médiu s metronidazolem se nejprve objevuje aerobní typ rezistence odpovídající klinickým izolátům. V další fázi vývoje, tzv. anaerobní rezistenci, výrazně klesá aktivita PFO a zároveň i aktivita hydrogenázy. Při konečné fázi anaerobní rezistence je aktivita enzymů hydrogenázy a PFO v podstatě nulová. Pro úplnou rezistenci trichomonád k metronidazolu musí být odstraněny klíčové komponenty jak klasické, tak alternativní dráhy aktivace metronidazolu zahrnující malic enzym a NADH:ferredoxin oxidoreduktázu. Po odstranění těchto komponent je parazit plně rezistentní k metronidazolu a přežívá i v jeho vysokých koncentracích (~ 1000 µg/ml) (Kulda, 1999).

Trichomonády rezistentní k metronidazolu kompenzují ztrátu energie pramenící z poklesu aktivit hydrogenosomálních enzymů PFO a malic enzymu zvýšenou aktivitou cytosolických enzymů laktát dehydrogenázy, pyruvát kinázy a NADP-dependentního jablečného enzymu. S těmito změnami jsou spojená i poměrná množství konečných produktů metabolismu. Se zvyšující se mírou rezistence roste produkce laktátu (až 92 % glukózy je přeměněno právě na tento produkt) a snižuje se produkce vodíku a acetátu (Čerkašová *et al.*, 1988; Kulda, 1999).

### 2.3.3 Aktivace a rezistence k metronidazolu u *T. vaginalis* ó nový pohled

V roce 2009 vyšla publikace (Leitsch *et al.*, 2009), která přináší nový pohled na aktivaci a vznik rezistence k metronidazolu u trichomonád a která zpochybňuje dosavadní poznatky o této problematice.

Práce vychází z poznatků o aktivaci metronidazolu u bakterií a u některých eukaryotních organismů (*Entamoeba histolytica*). U bakterie *Helicobacter pylori* je redukce metronidazolu přisuzována NAD(P)H-nitroreduktázám *rdxA* a *frxA* (Goodwin *et al.*, 1998; Aldana *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2008). U parazitického organismu *Entamoeba histolytica* byla popsána aktivace metronidazolu pomocí enzymu thioredoxin reduktázy (Leitsch *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2008). Homolog tohoto enzymu se též vyskytuje u *Trichomonas vaginalis* a jeho funkce spoívá především v ochraně buňky před kyslíkovými radikály (Coombs *et al.*, 2004). Při analýze genomu *T. vaginalis* bylo objeveno, že geny kódující nitroreduktázy jsou u trichomonád přítomny celkem v 11ti kopiích (*Tvntr1* až *Tvntr11*) (Pal *et al.*, 2008).

Leitsch *et al.* (Leitsch *et al.*, 2009) se dále zabývali tím, je-li nitroradikálový anion i dále redukováný metabolit metronidazolu hlavní toxické činidlo. V mnoha *in vitro* studiích bylo sledováno, že jedno a/nebo dvouvláknové zlomy DNA způsobuje elektrochemicky generovaný nitroradikálový anion (Edwards, 1993a). V rozporu s tím je pozorování, že chemická redukce metronidazolu dithionitánem (LaRusso *et al.*, 1978) nevedla k dvouvláknovým zlomům, ale spíše ke kovalentní vazbě reaktivních metronidazolových meziproduktů na DNA (Lindmark and Müller, 1976) a proteiny (West *et al.*, 1982). Avšak buňky *T. vaginalis* vystavené působení metronidazolu se nepodařilo pohybovat a zemřely velmi rychle, což je velmi typické pro usuzovat poškození DNA, jehož následky by spíše vedly k apoptóze v mnohobuněčném organismu nebo k inhibici růstu u jednobuněčného organismu (Leitsch *et al.*, 2009).

Zkoumání hydrogenosomálních proteinů pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy, malát dehydrogenázy dekarboxylující a ferredoxin, které jsou dle převažujícího konceptu hlavním aktérem v aktivaci metronidazolu, s 2,2-dipyridylem přineslo zajímavý poznatek. Trichomonády přestávající v médiu s dipyridylem, chelátovaným činidlem, ztratily téměř kompletní aktivitu těchto proteinů, avšak byly stále plně citlivé k metronidazolu (Leitsch *et al.*, 2009).

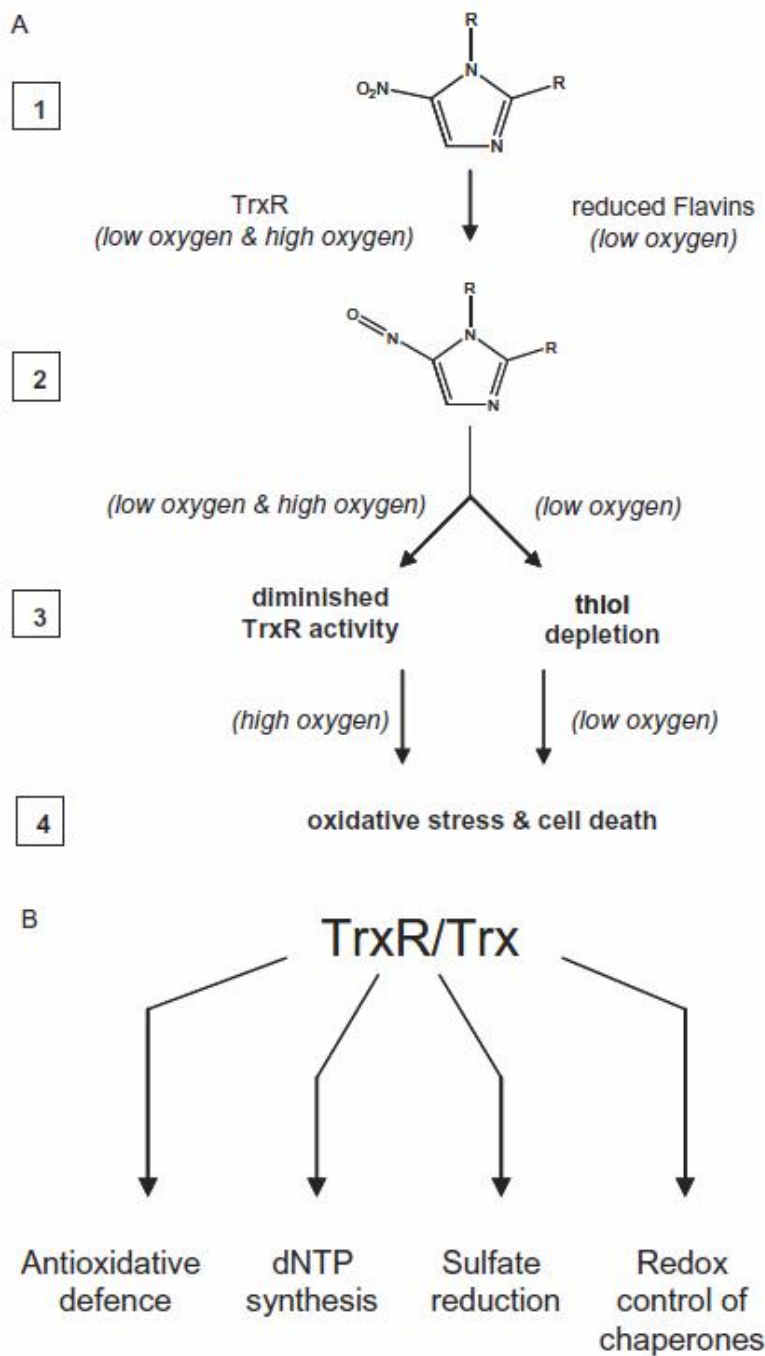
Leitsch *et al.* ve své práci předpokládají, že thioredoxin reduktáza je u *T. vaginalis* klíčovým enzymem v aktivaci metronidazolu. U buněk přestávajících s nitroimidazolem projevovala thioredoxin reduktáza značně sníženou schopnost redukovat thioredoxin, pravděpodobně kvůli vytváření kovalentních sloučenin s nitroimidazolovými intermediáty.

Snížená aktivita thioredoxin reductázy následně vedla ke snížení aktivity enzymů, jejichž funkce jsou závislé na thioredoxinu. Je tedy usuzováno, že nitroimidazoly rozvracíjí buněnou redoxní rovnováhu jednak snížením aktivity thioredoxin reductázy, jednak poklesem hladiny thiolů. Dále auto i dokládají, že také rozklad peroxidu vodíku peroxidázami je omezený shodně s poklesem aktivity thioredoxin reductázy díky působení nitroimidazolů (Leitsch *et al.*, 2009).

Snížená aktivita thioredoxin reductázy by mohla být další nevýhodou pro *T. vaginalis* při střetnutí s hostitelským obranným systémem, který zahrnuje tvorbu molekul zodpovědných za oxidativní stres. Kromě toho i některé další fyziologické procesy u *T. vaginalis* potřebují thioredoxin, jako například syntéza dNTP enzymem ribonukleotid reductázou, dále redukce sulfátů a redoxní kontrola chaperonů, a mohlo by to tedy být pro buňky fatální (Leitsch *et al.*, 2009).

V aktivaci a tudíž i v rezistenci k metronidazolu budou pravděpodobně zapojeny nejen flavinové enzymy, ale i volně redukované flaviny (Clarke *et al.*, 1980). Thioredoxin reductáza je v plně rezistentních buňkách k metronidazolu z velké části inaktivní a při velmi nízké nebo nulové aktivitě thioredoxin nedochází k redukci FAD, FMN a riboflavinu u buněk rezistentních k metronidazolu, zatímco buňky citlivé na metronidazol ochotně tyto flaviny redukuje. Tento objev nasvědčuje, že hladiny redukovaných flavinů u buněk rezistentních k metronidazolu jsou patrně velmi nízké (Leitsch *et al.*, 2009).

Lze předpokládat, že ztráta aktivity flavin reductázy u rezistentních buněk *T. vaginalis* narušuje metabolismus železa, tudíž se snižuje i exprese PFO a hydrogenosomální malát dehydrogenázy (dekarboxylující). Přesto zůstává *T. vaginalis* i za nedostatku železa plně citlivá k metronidazolu, což v podstatě popírá dosavadní model aktivace nitroimidazolů v trichomonádách. Autoři se podle svých dosavadních pozorování domnívají, že ztráta železosírných enzymů a dalších hydrogenosomálních drah u *T. vaginalis* rezistentních k metronidazolu není důvodem, ale pravděpodobně následkem rezistence k metronidazolu, a touto je také narušení buněného metabolismu flavinů (obr. 10) (Leitsch *et al.*, 2009).



**Obr. 10. Předpokládaný model aktivace nitroimidazolu u *T. vaginalis* dle nového konceptu (Leitsch *et al.*, 2009).**

A) Nitroimidazoly vstupují do buňky pasivní difúzí (1) a jsou redukovány pomocí flavinových enzymů, například thioredoxin reduktázou (TrxR), i redukovanými volnými flaviny. Kyslík reaguje s nitroradikálovým aniontem a dochází k jeho re-oxidaci ještě před tím, než by vznikl další metabolit, nitrosoimidazol (2). Nitroimidazoly i jejich následně redukované

metabolity tvoří kovalentní sloučeniny s thiolovými skupinami. Za nízké koncentrace kyslíku je redukce nitroimidazol mnohem účinnější a vede k vyerpání intracelulárních thiolů.

Tvorba kovalentních sloučenin s nitroimidazolovými metabolity také snižuje aktivitu thioredoxin reductázy, což pravděpodobně vede ke zhoršené obraně buňky proti kyslíkovým radikálům, protože pro správnou funkci enzymu peroxidáz je aktivita thioredoxin nezbytná. V přítomnosti vyšší koncentrace kyslíku (4) vede patrně situace k akumulaci  $H_2O_2$  způsobující oxidaci thiolů a proteinů a vytvoření velmi nebezpečných hydroxylových radikálů. V přítomnosti nízké koncentrace kyslíku vede nedostatek thiolů také k narušení dělení buněk a pravděpodobně i ke ztrátě esenciálních thiolů, jako je například koenzym A (Leitsch *et al.*, 2009).

B) Fyziologické procesy v *T. vaginalis*, o kterých je známo i o kterých se předpokládá, že potřebují thioredoxiny ke své správné funkci: Thioredoxiny jsou nezbytné v ochraně buňky proti kyslíkovým radikálům, protože obnovují katalytickou funkci peroxidáz (Coombs *et al.*, 2004) a methionin sulfoxid reductáz (Boschi-Müller *et al.*, 2005). Thioredoxiny jsou také důležité pro správné fungování ribonukleotid reductázy, enzymu vystupujícího v syntéze dNTP (Nordlund and Richard, 2006). Thioredoxiny jsou též významné pro skládání některých proteinů, například chaperon (Berndt *et al.*, 2008), a rovněž se ukázaly jako důležité enzymy v syntéze seleno-sírných skupin u *Escherichia coli* (Ding *et al.*, 2005).

V roce 2010 vyšel článek (Leitsch *et al.*, 2010) zaměřující se na změny v buňkách trichomonád způsobené přidáním látky difenyljodid (DPI) do kultivačního média. Tento inhibitor flavinů vytváří s proteiny obsahujícími flavin kovalentní adukty a má tudíž vliv na jejich správnou funkci. Leitsch *et al.* poukazují na fakt, že aktivity enzymů thioredoxin reductázy a flavin reductázy jsou v přítomnosti DPI výrazně sníženy.

Aktivita enzymů PFO a malic enzymu byla také snížena téměř na nulu, na rozdíl od enzymů thioredoxin peroxidázy, superoxid dismutázy a laktát dehydrogenázy, jejichž exprese byla velmi zvýšena. Pokusy ukázaly, že již během několika hodin se staly buňky inkubované v médiu s DPI necitlivé k metronidazolu, a to i za velmi vysoké koncentrace metronidazolu. Tato studie předpokládá, že kroky vedoucí k narušení buněčného metabolismu flavinů u *T. vaginalis* pomocí DPI, jsou obdobné s těmi, odehrávajícími se u buněk rezistentních k metronidazolu *in vitro* (Leitsch *et al.*, 2010).

## 2.4 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs) u *Trichomonas vaginalis*

V roce 1999 vyšla publikace (Brown *et al.*, 1999), ve které byly popsány u *Trichomonas vaginalis* dva enzymy karbohydrátového metabolismu, tzv. alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KOR1 a KOR2). Podle autorů jsou tyto enzymy jsou pravděpodobně plně aktivní v trichomonádách rezistentních k metronidazolu, na rozdíl od hydrogenosomálního enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy. Tyto enzymy patrně dokáží špešit aktivaci metronidazolu, protože neuvolují elektrony, které by předávaly ferredoxinu a ty následně metronidazolu (Brown *et al.*, 1999). Brown *et al.* navrhovali, že by KORs mohly představovat pro trichomonády rezistentní k metronidazolu náhradní zdroj energie. Acyl-CoA, který se tvoří v reakci katalyzované pomocí KORs, by mohl být zpracován enzymy ASCT a STK za vzniku ATP. O tom, zda tyto enzymy jsou aktivní v trichomonádách rezistentních k metronidazolu (Ellis *et al.*, 1992). Acyl-CoA, produkovaný také pomocí KORs, by patrně mohl být využit k tvorbě energie v zatím nedefinované dráze.

Tyto enzymy pravděpodobně metabolizují, stejně jako PFO, širokou škálu substrátů, například pyruvát, -ketobutyrát a -ketomalonát, zahrnující také deaminované formy aromatických aminokyselin, například indolpyruvát a fenylnpyruvát. Avšak ani jedna z alternativních oxidoreduktáz nedokáže zpracovat -ketobutyrát (Brown *et al.*, 1999). Podle autorů citované práce jsou díky těmto vlastnostem jsou tyto enzymy nezbytné k přežití trichomonád rezistentních k metronidazolu a představují pro trichomonády rezistentní k metronidazolu alternativní zdroj energie.

Brown *et al.* se domnívají, že tyto alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy nesdílejí homologii s PFO žádného organismu. Avšak při analýze genomu trichomonád nebyla nalezena sekvence genů těchto KORs a v proteomu také nebyly tyto enzymy identifikovány.

### 3 Cíle práce

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na charakterizaci enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy D (PFOD), a to s těmito cíli:

- 1) Připravit nativní rekombinantní protein PFOD parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis* v bakteriích *Escherichia coli* a kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a použít jej pro další studie.
- 2) Připravit rekombinantní protein k vytvoření specifické polyklonální protilátky proti nekonzervativní oblasti PFOD a pomocí ní lokalizovat PFOD v buňce *T. vaginalis*.
- 3) Exprimovat rekombinantní protein PFOD v rezistentních buňkách prvoka *T. vaginalis* a studovat vliv toho proteinu na rezistenci k metronidazolu.
- 4) Zjistit relativní expresi všech PFO genů u parentních a rezistentních buněk *T. vaginalis* metodou kvantitativní Real Time PCR.
- 5) Charakterizovat alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy a identifikovat příslušné proteiny s cílem určit jejich vztah k PFOD.



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Buněné kultury

#### 4.1.1 *Trichomonas vaginalis*

Pro amplifikaci genu *pfod* byla použita celková DNA izolovaná z buněk *Trichomonas vaginalis* kmene T1 (poskytnutý od J. H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taiwan). V pokusech zacílených na kvantitativní Real Time PCR byla použita RNA z *T. vaginalis* parentního kmene 10-02 (Kulda *et al.*, 1982) a rezistentního kmene Tv 10-02 MR 100 (Kulda *et al.*, 1993). V pokusech zaměřených na transformaci buněk byl použit kmen trichomonád T1 a Tv 10-02 MR 100.

Buňky *T. vaginalis* 10-02, respektive T1 byly udržovány v axenické kultuře v médiu TYM pH 6,2 bez agaru (Diamond, 1957) v 10 ml –roubovacích skleněných zkumavkách, respektive v 10ml zkumavkách v termostatu při teplotě 37 °C. Kultura byla ořezávána do prvního média každých 24 hodin. Pro získání většího množství kultury byly buňky převedeny z jedné zkumavky do 100 ml média TYM bez agaru. Po 24 hodinách kultivace byla tato kultura převedena do 1 l média TYM bez agaru. Kultura byla zpracována po 24 hodinové kultivaci.

Buňky *T. vaginalis* 10-02 MR 100 byly udržovány v axenické kultuře v médiu TYM pH 6,2 s 0,05% agarem a metronidazolem (100 g/ml) v 10 ml –roubovacích zkumavkách v termostatu při teplotě 37 °C. Kultura byla ořezávána do prvního média každých 24 hodin. Pro získání většího množství kultury byly buňky během této pasáže převedeny do TYM média bez agaru s metronidazolem (50 g/ml). Poté byly tyto zkumavky s rezistentními trichomonádami naořezávány do objemu 50 ml média bez agaru s metronidazolem. Po 24 hodinách byla tato kultura převedena do dvojnásobného objemu média afl na výsledný objem 1 l.

### 4.1.2 *Escherichia coli*

B hem práci byly používány bakterie *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). Transformace buněk plasmidem nesoucím vložený gen *pfod* byla provedena dle doporučeného protokolu výrobce tepelným šokem při 42 °C 45 vteřin. Bakterie byly kultivovány na LB/agarových plotnách se specifickými antibiotiky při 37 °C pro selekci pozitivních klonů.

K produkci rekombinantních proteinů byly použity bakterie *E. coli* BL21 DE3 (obsahují ženské netytických tRNA, které umožní expresi genů s vzácnými kodony) a *E. coli* BL21 GRoES/EL (obsahují chaperony Hsp60 a Hsp10 rovněž pro správné skládání proteinů). Transformace i kultivace buněk byly prováděny obdobným způsobem jako u kmene TOP 10.

### 4.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Pro expresi rekombinantního proteinu PFOD byly použity kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene YPH499. Buňky byly kultivovány na YPD/agarových plotnách při 30 °C. V případě transfekovaných linií byly buňky kultivovány v tekutém YPGal médiu s přidáním nourseothricinem (50 g/ml) (Sigma) pro selekci pozitivních klonů.

## 4.2 Kultivační média

Médium TYM pro kultivaci *T. vaginalis* T1 (Diamond, 1957)

| <b>Diamondovo médium TYM pH 6,2</b> |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| <b>navážky g</b>                    | <b>V média - 0,5 l</b> |
| Trypton                             | 10 g                   |
| Yeast extract                       | 5 g                    |
| Maltóza                             | 2.5 g                  |
| L-cystein hydrochlorid              | 0.4 g                  |
| Kyselina askorbová                  | 0.1 g                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0.4 g                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 0.4 g                  |
| Citrát železito-amonný (86 mM)      | 500 μl                 |
| Destilovaná voda                    | do 450 ml              |
| Koňské sérum                        | 50 ml                  |

Upravit pH na hodnotu 6,2 a sterilizovat v autoklávu 30 minut při 120 °C. Poté přidat 50 ml inaktivovaného koňského séra (inaktivace séra při 56 °C po dobu 30 minut).

### Slovenské médium pro kultivaci *T. vaginalis* Tv 10-02 a Tv 10-02 MR 100

| <b>Slovenské médium TYM pH 6,2</b> |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| <b>naváfky g</b>                   | <b>V média - 0,5 l</b> |
| BBL trypticase pepton              | 10 g                   |
| Kvasni ný autolyzát                | 5 g                    |
| Maltóza                            | 2.5 g                  |
| L-cystein hydrochlorid             | 0.4 g                  |
| Kyselina askorbová                 | 0.1 g                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 0.4 g                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | 0.4 g                  |
| Destilovaná voda                   | do 450 ml              |
| Citrát železito-amonný (86 mM)     | 500 l                  |
| Agar                               | 0,25 g                 |
| Ko ské sérum                       | 50 ml                  |

Upravit pH na hodnotu 6,2 a sterilizovat v autoklávu 30 minut p i 120 °C. Poté p idat 50 ml inaktivovaného ko ského séra (inaktivace séra p i 56 °C po dobu 30 minut).

(BBL trypticase pepton ó Dickinson and Company; Maltóza ó Sigma; L-cystein hydrochlorid ó Sigma; Kyselina askorbová - Sigma; Ko ské sérum ó Invitrogen; Agar ó Oxoid; Yeast extract ó Oxoid; Kvasni ný autolyzát ó Imuna pharm; Trypton - Oxoid)

### YPD a YPGal média pro kultivaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* kmene YPH499.

| <b>YPD</b>           |                        |
|----------------------|------------------------|
| <b>naváfky g</b>     | <b>V média - 0,5 l</b> |
| Proteose peptone     | 10 g                   |
| Kvasinkový autolyzát | 5 g                    |
| D-glukóza            | 2.5 g                  |
| Destilovaná voda     | 500 ml                 |

| <b>YPGal</b>         |                        |
|----------------------|------------------------|
| <b>naváfky g</b>     | <b>V média - 0,5 l</b> |
| Proteose peptone     | 10 g                   |
| Kvasinkový autolyzát | 5 g                    |
| D-galaktóza          | 2.5 g                  |
| Destilovaná voda     | 500 ml                 |

Ob média sterilizovat v autoklávu 20 minut p i 120 °C.

(D-glukóza - Lach:Ner; D-galaktóza - Sigma)





PCR reakce probíhala za následujících podmínek:

| Krok            | Teplota (°C) | Doba trvání (minuty) | Počet opakování |
|-----------------|--------------|----------------------|-----------------|
| Iniciace        | 94           | 5                    | 1               |
| Denaturace      | 94           | 1                    | 15              |
| Nasedání primer | 60 - 45*     | 1                    | 15              |
| Syntéza         | 72           | 2                    | 15              |
| Denaturace      | 94           | 1                    | 30              |
| Nasedání primer | 45           | 1                    | 30              |
| Syntéza         | 72           | 2                    | 30              |
| Syntéza         | 72           | 7                    | 1               |
| Chlazení        | 4            | 0                    |                 |

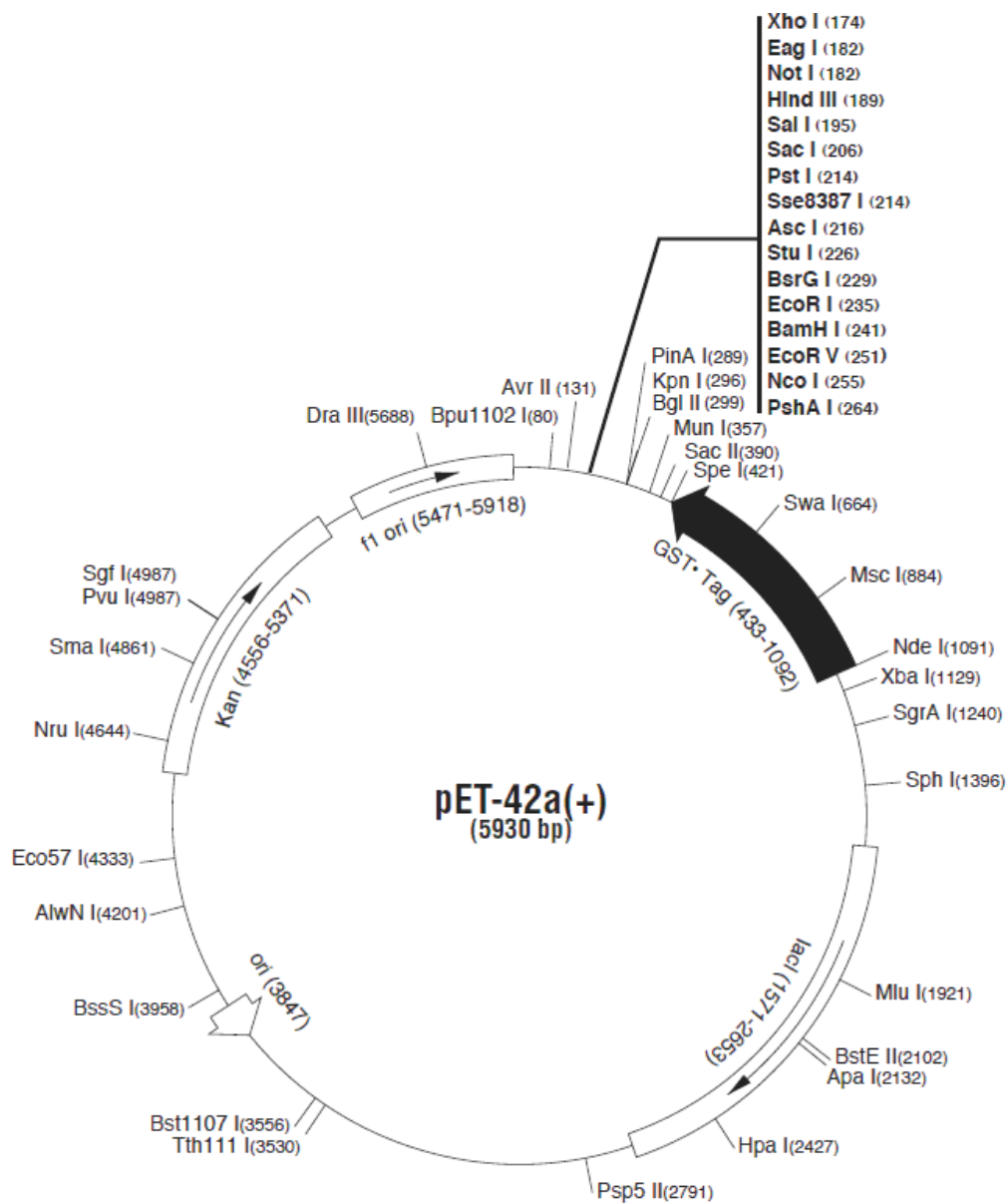
\* V každém cyklu byla teplota snížena o 1 °C.

### 4.3.2 Použití plasmidy

Pro expresi genu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy D (PFOD) v trichomonádách byl použit vektor TagVag (obr. 13) (poskytnutý Mgr. Petrem Radou, Ph.D., katedra parazitologie P F UK). Pro expresi PFOD v bakteriích *E. coli* byl použit vektor pET-42b+ (obr. 11) (Novagen) a pro expresi v kvasinkách vektor pYM-N23 (obr. 12) (poskytnutý Mgr. Vratislavem <sup>TM</sup>ovíkem, katedra genetiky a mikrobiologie P F UK).

#### 4.3.2.1. Expresní plasmid pET-42b+

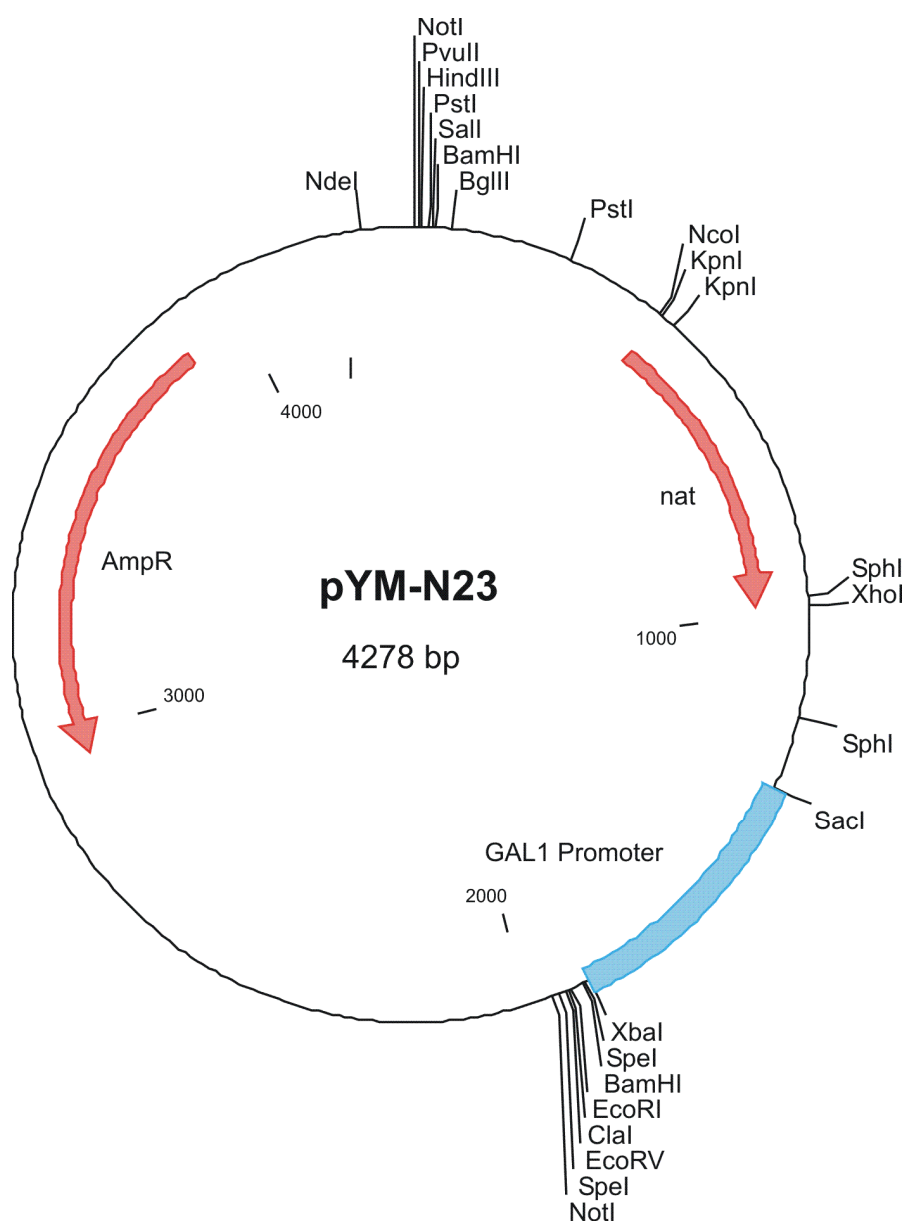
Tento plasmid obsahuje silný bakteriální T7 promotor a T7 terminátor a gen pro rezistenci ke kanamycinu (Kan; selekční značení). Expresí vloženého genu je indukovaná pomocí IPTG (Isopropyl -D-1-thiogalaktopyranosid; IPTG se váže na lac represor a uvolní ho z lac operonu (lacI), což umožní expresi genu v lac operonu). Vektor je dlouhý 5930 pár bazí bez inzerty. Jako restrikční místa pro PFOD byla použita *Xba*I a *Bsr*GI. Plasmid obsahuje 6x His tag a glutathion S-transferázový (GST) tag.



**Obr. 11: Mapa expresního plasmidu pET-42b+ (Novagen) (p evzato z <https://wasatch.biochem.utah.edu/chris/links/pET42.pdf>).**

### 4.3.2.2 Expresní plasmid pYM-N23

Expresní kvasinkový plasmid pYM6N23 obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu (AmpR) pro selekci v bakteriích a gen pro rezistenci k nourseotricinu (nat) pro selekci v kvasinkách. Exprese vloženého genu je řízena silným galaktósovým promotorem (GAL 1). Vektor je dlouhý 4278 pár bazí bez inzertu. Jako restrikční místa pro PFOD byla použita *XbaI* a *ClaI*.

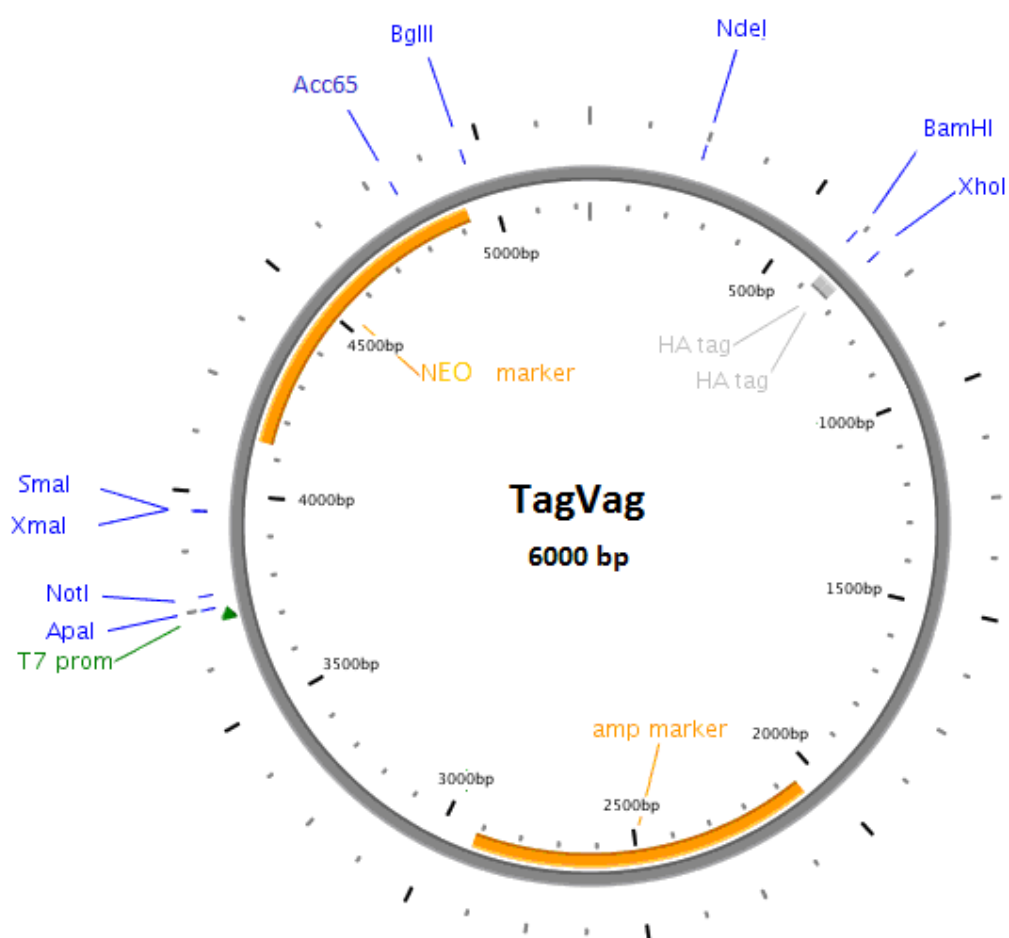


**Obr. 12: Mapa expresního plasmidu pYM-N23** (Euroscarf). (P evzato z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/pYM-N23.html>).



### 4.3.2.3 Expresní plasmid TagVag

Plasmid TagVag je vektor určený k expresi proteinů v trichomonádách. Obsahuje T7 promotor (T7 prom), gen pro rezistenci k ampicilinu (Amp marker) v bakteriích, gen pro rezistenci ke geneticinu (NEO marker) v trichomonádách a hemaglutininové značení (2x Ha tag). Vektor je dlouhý přibližně 6000 párů bazí bez inzertu. Jako restrikční místa pro PFOD byla použita *Acc65* a *VspI*, které je kompatibilní s *NdeI* (izoschizomery).



Obr. 13: Mapa expresního plasmidu TagVag (Hrdý *et al.*, 2004).

### 4.3.3 Klonování *pfod* do pET-42b+

- 1) K namnožení amplifikovaného genu *pfod* (gene number TVAG\_096520) v *E. coli* byl použit kit pGem®-T Easy Vectors System (Fermentas). Ligační směs byla namíchána dle doporučeného postupu výrobce a byla použita pro transformaci kompetentních bakterií TOP 10 tepelným šokem. Transformované bakterie byly naneseny na LB/agarové plotny s ampicilinem (100 µg/ml) (Sigma) a kultivovány přes noc v termostatu při 37 °C. Pozitivní buňky byly vybrány pomocí modro-bílé selekce přidáním X-Galu (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galaktopyranosid; pozitivní kolonie buněk jsou bílé, gen pro galaktozidázu je přerušeno vloženou DNA. V opačném případě jsou buňky modré).
- 2) Několik kolonií bylo otestováno na přítomnost plasmidu s inzertem *pfod*. Test proběhl pomocí PCR z buněk *E. coli* za použití stejných podmínek jako při amplifikaci *pfod*. Pozitivní kolonie byly napěstovány přes noc v stejném LB médiu s ampicilinem při 37 °C a 225 otáček za minutu (RPM) na rotačním inkubátoru. Plasmidy byly z bakteriálních kultur vyizolovány QIAprep Spin Miniprep Kitem (Qiagen) a pomocí sekvenace byla provedena kontrola mutací a správného vložení inzertu do plasmidu.
- 3) Ověřený inzert byl z plasmidu pGEM vytěpen dvojicí specifických restrikčních enzymů a přetřen pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Stejným způsobem byl přetřen i plasmid pET-42b+ s histidinovým značením (His tag). Připravený inzert s kohezními konci byl vložen do expresního plasmidu. Ligační reakce s použitím T4 DNA ligázy (Fermentas) byla namíchána dle doporučeného postupu výrobce, přítomností plasmidu a inzertu v reakci bylo poměří 1:1 (určeno vizuálně na agarózové elektroforéze). Celá ligační reakce byla použita pro transformaci kompetentních bakterií TOP 10 tepelným šokem. Transformované bakterie byly naneseny na LB/agarové plotny s kanamycinem (50 µg/ml) (Sigma) a kultivovány přes noc v termostatu při 37 °C.
- 4) Z narostlých kolonií bylo několik otestováno na přítomnost plasmidu s inzertem pomocí PCR (viz str. 38). Pozitivní klony byly napěstovány v LB médiu při 37 °C a 225 RPM. Poté z nich byly vyizolovány plasmidy a pomocí sekvenace byla provedena kontrola mutací a správného vložení inzertu do expresního plasmidu.
- 6) Ověřený plasmid s inzertem byl použit pro transformaci kompetentních buněk BL21 tepelným šokem dle doporučeného protokolu výrobce. Pozitivní bakterie byly použity pro test exprese proteinu PFOD.

#### 4.3.3.1 Test exprese PFOD

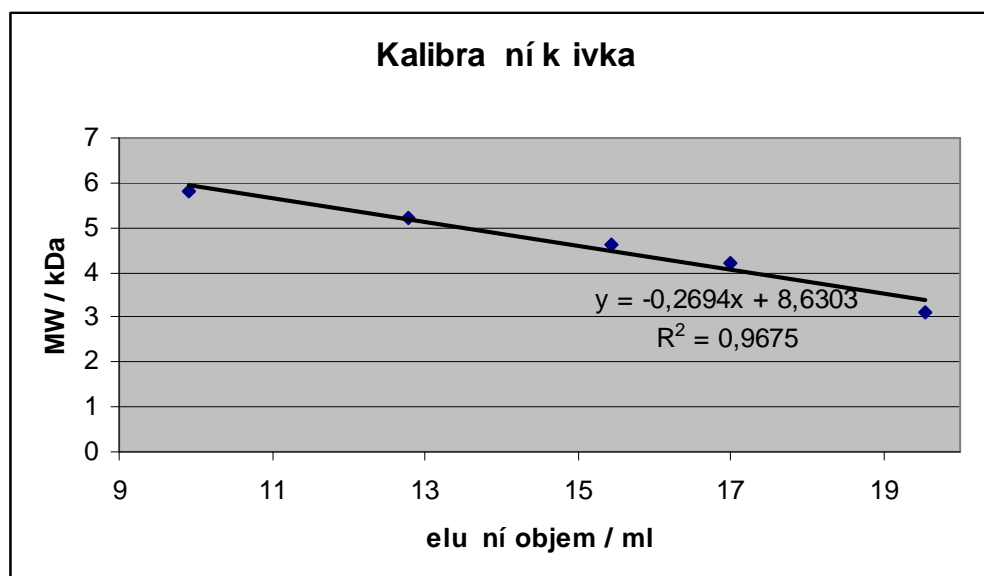
- 1) Z narostlé kultury bun k odebrat 1 ml a p enést do 15 ml erstvého LB média. Bun ná kultura byla kultivována jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek (v uzav ených zkumavkách).
- 2) T epat p i 225 RPM a 30 °C do OD<sub>600</sub> 0,4 - 0,6 (optická denzita m ená na S800 Diode Array spektrofotometru (Biochrom) p i vlnové délce 600 nm).
- 3) Po dosažení pohlávané OD odebrat 0,5 ml jako kontrolní vzorek a kulturu dále indukovat 24 hodin p i 225 RPM a 30 °C s 0,5 mM IPTG, 400 M síranem felezito-amonným. Test exprese probíhal také s t mito terminálními akceptory elektron : 2 mM dusi nanem sodným (NaNO<sub>3</sub>), 2 mM DMSO (dimethyl sulfoxid) a 2 mM fumarátem.
- 5) Po 24 hodinové kultivaci odebrat 0,5 ml jako kontrolní vzorek.
- 6) Vzorky denaturovat se vzorkovým pufrem pro SDS elektroforézu (dle doporu eného protokolu výrobce, Bio-Rad) 5 minut ve vroucí vod a ov it expresi rekombinantního proteinu pomocí SDS elektroforézy, Western blotu a specifických protilátek.
- 7) Klon bakterií, který nejlépe exprimovat PFOD, byl indukován v objemu 2 l. Kulturu byla sto ena p i 4 000 x g, 10 minut, 4 °C Bakteriální pelet byl poufít pro purifikaci PFOD za nativních podmínek.

#### 4.3.3.2 Nativní purifikace PFOD

- 1) Pelet bakterií obsahují rekombinantní protein rozsuspendovat ve 20 ml fosfátového pufru s 10 mM imidazolem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20% glycerol, 10 mM imidazol, 1 mM dithiosi i itan sodný (reduk ní inidlo), pH 8,5).
- 2) P idat 1 mg/ml lysosymu, 1 mg/ml DNázy, 2 l/ml leupeptinu a 2 l/ml TLCK.
- 3) Suspenzi 20 minut inkubovat na ledu.
- 4) Suspenzi homogenizovat na p ístroji French press cell disruptor (124 000 kPa).
- 5) Homogenát sto it na centrifuze Beckman rotor Ti 50.2 p i 82 000 x g, 30 minut, 4 °C.
- 6) His-tagovaný protein izolovat ze supernatantu afinitní purifikací na kolon s náplní Ni-NTA agarózy za nativních podmínek dle doporu eného protokolu výrobce (Qiagen). Protein elulovat z kolony pomocí nespojitého gradientu pufr se zvy-ujícím se obsahem imidazolu (10 mM a 250 mM). Elu ní frakce obsahující rekombinantní protein zahustit (Amicon Ultra Concentrator, Millipore) a analyzovat pomocí SDS PAGE, Western blotu a specifických protilátek proti histidinovému zna ení.

#### 4.3.3.3 Stanovení molekulové hmotnosti PFOD

Molekulová hmotnost PFOD byla determinována pomocí kapalinové chromatografie (BioLogic Duo Flow systém, Bio-Rad) na molekulárním sítu. Kolona obsahující SUPERDEX 200 (kolona 10/300GL, GE Healthcare) byla promyta 50 mM fosfátovým puřem s 400 mM imidazolem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20% glycerol, 400 mM imidazol, 1 mM dithiosi i itan sodný, pH 8,5). Frakce obsahující rekombinantní PFOD byla poté aplikována na kolonu. Nativní molekulová hmotnost enzymu byla vypočtena z kalibrační křivky (obr. 14) pomocí standard (670 kDa, 158 kDa, 44 kDa, 17 kDa a 1,35 kDa).



Obr. 14: Kalibrační křivka kolony Superdex 200 s logaritmy molekulárních hmotností standardů (osa y). Rovnice byla použita pro výpočet nativní molekulární hmotnosti PFOD.

## 4.3.4 Příprava rekombinantního proteinu na protilátku proti PFOD

### 4.3.4.1 Exprese proteinu

Sekvence požadovaného inzertu byla navržena z nekonzervativní oblasti PFOD *T. vaginalis* (Obr. 20). Amplifikovaný inzert byl namnožen v plasmidu pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors System, zaklonován do expresního plasmidu pET-42b+ s histidinovým značením (6x His tag) a exprimován v bakteriích *E. coli* BL 21 (DE3). Jeden z pozitivních klonů byl kultivován při 37 °C v objemu 3 l LB média s předaným kanamycinem (50 µg/ml). Po nástupu kultury na OD<sub>600</sub> 0,4 - 0,6 byla zahájena exprese proteinu předáním 0,5 mM IPTG. Po 6 hodinách byla buněná kultura centrifugována při 4 000 x g, 15 minut a 4 °C.

Cílový his-tagovaný protein byl izolován z bakterií afinitní purifikací pomocí Ni-NTA agarózy (Qiagen) a poté předtín pomocí TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin kolony (Clontech). Obě procedury byly prováděny za denuračních podmínek pomocí 8 M močoviny. Protein byl z kolony eluován pomocí specifických pufrů pro předtínění rekombinantního proteinu za denuračních podmínek se snižujícími se hodnotami pH (5,9 až 4,5) dle doporučeného protokolu výrobce (Qiagen). Přítomnost proteinu v jednotlivých izolovaných frakcích byla testována pomocí SDS elektroforézy, Western blotu a specifických protilátek proti histidinovému značení.

Frakce, která obsahovala nejvíce proteinu, byla rozdělena podle molekulové hmotnosti na 15% preparativní SDS-PAGE (BioRad) 5 hodin při 250 V a 4 °C. Gel byl obarven roztokem barvy Coomassie Brilliant Blue (250 mg CBB R-250, 225 ml destilovaná voda, 225 ml metanol, 50 ml kyselina octová). Protein o předpokládané velikosti (v množství cca 600 µg) byl vyiznut, promyt v PBS (Phosphate Buffer Saline; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,53 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1000 ml destilované vody, pH 7,4) a zaslán do firmy Eurogentec (Belgie) jako antigen pro imunizaci dvou králíků.

### 4.3.5 Klonování *pfod* do kvasinkového vektoru pYM-N23

- 1) K namnožení amplifikovaného genu *pfod* byl použit GENEART® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen). Ligační reakce, namíchaná dle doporučeného protokolu výrobce, byla použita pro transformaci kompetentních bakterií TOP 10 tepelným šokem. Transformované bakterie byly naneseny na LB/agarové plotny s ampicilinem (50 g/ml) (Sigma) a kultivovány přes noc v termostatu při 37 °C.
- 2) Některé kolonie bylo otestováno na přítomnost plasmidu s inzertem pomocí PCR. Pozitivní kolonie byly napěstovány v LB médiu s přidáním antibiotiky při 37 °C a 225 RPM. Plasmidy byly poté z bakteriálních kultur izolovány kitem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Pomocí sekvenace byla provedena kontrola mutací a správného vložení inzertu do plasmidu.
- 3) Ověřené plasmidy s vloženým genem *pfod* byly použity pro transformaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (postup viz níže). Pozitivní klony byly kultivovány v 5 ml YPD média (str. 35) s nourseothricinem (50 g/ml) (Sigma) přes noc při 225 RPM a 30 °C a použity pro test exprese.

#### 4.3.5.1 Transformace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

- 1) Přes noc napěstovat kvasinky kmene YPH499 v 5 ml YPD média při 30 °C a 225 RPM. Kvasinky stáhnout při 1 000 x g, 5 minut, 21 °C a resuspendovat ve sterilní vodě či PBS.
- 2) Buňky stáhnout při 1 000 x g, 1 minutu, 21 °C a odlít PBS.
- 3) Buňky resuspendovat v 1 ml v 0,1 M octanu litném (LiAc) (Schiestl and Gietz, 1989) a inkubovat 10 minut při 30 °C.
- 4) Stáhnout buňky při 1 000 x g, 3 minuty a 21 °C.
- 5) K peletu kvasinek (50 l) přidat: 300 l 40% polyethylenglykolu (PEG, typ 3350)  
42 l 1 M LiAc  
10 l SSD (salmon sperm DNA; nosičová DNA)  
18 l plasmidu s inzertem
- 6) Buňky 1 minutu vortexovat a poté inkubovat 30 minut při 30 °C.
- 7) Tepelný šok 30 minut při 42 °C.
- 8) Buňky stáhnout 3 minuty při 1 000 x g a 21 °C. Pelet resuspendovat ve 200 l sterilní destilované vody, rozetít na YPD/agarové plotny s nourseothricinem (50 g/ml) a kultivovat při 30 °C.

#### 4.3.5.2 Test exprese PFOD v kvasinkách

- 1) Kulturu kvasinek p enést do 10 ml ístého tekutého YPD média a t epat p i 225 RPM a 30 °C do OD<sub>600</sub> 0,4 ó 0,6.
- 2) Po dosažení požadované hustoty odebrat 0,5 ml kultury jako kontrolní vzorek. Kulturu sto it p i 1 000 x g, 5 minut, 21 °C, p enést do 10 ml YPGal média (médium obsahuje galaktózu, která indukuje expresi genu pro protein PFOD na galaktózovém promotoru) a t epat 72 hodin p i 225 RPM a 30 °C.
- 3) Každých 24 hodin odebírat kontrolní vzorky (0,5 ml kultury) (celkem odebrat 7 vzork ). Poté kulturu sto it p i 1 000 x g, 10 minut, 4 °C a pelet uschovat jako p ípadný zdroj rekombinantního proteinu. Kontrolní vzorky denaturovat se vzorkovým puřrem pro SDS elektroforézu 5 minut ve vroucí vod . Ov ít expresi rekombinantního proteinu pomocí SDS elektroforézy, Western blotu a specifických protilátek proti histidinovému zna ení.

#### 4.3.6 Amplifikace a klonování *pfod* do vektoru TagVag

Amplifikace a klonování inzertu do vektoru TagVag (obsahující 2x HA-tag) probíhaly obdobn ě jako u *pfod* do vektoru pET-42b+. Gen *pfod* byl amplifikován bez signální sekvence. Pro namnoření *pfod* byl pouřit kit pGem<sup>®</sup>-T Easy Vectors System a bakterie TOP 10. Ov ený a vy-t pený inzerť byl vlořen do expresního plasmidu TagVag s pouřitím T4 DNA ligázy. Liga ní sm s byla pouřita pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 tepelným -okem.

Pozitivní klony byly kultivovány p es noc ve 100 ml LB média p i 37 °C. Plasmidy s inzertem byly vyizolovány kitem GIAPrep Spin MIDIPrep Kit (Qiagen) a pouřity pro elektroporaci trichomonád (postup viz nířle). Koncentrace plasmidu ve vzorcích byla stanovena na p ístroji NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer.

### 4.3.7 Elektroporace trichomonád

#### 4.3.7.1 Kmen T1

- 1) Sterilně odstát 100 ml trichomonád při 1200 x g, 15 minut a 4 °C.
- 2) Odsát médium, zvážit pelet a na každý gram přidat 0,5 ml TYM média bez agaru.
- 3) Buňky resuspendovat a 4 x protáhnout přes 23G jehlu (co nejméně při tom přelit).
- 4) Do 4 mm kyvety (4 MM Gene Pulser Cuvette; Bio-Rad; 4 milimetry široký sloupec elektroporané suspenze) napipetovat 300 µl suspenze buněk a 30 µl plasmidu.
- 5) Nechat kyvety chvíli stát na ledu.
- 6) Elektroporovat buňky při časové konstantě 175 ms a 350 V (elektroporátor GenePulser Xcell, Bio-Rad).
- 7) Buňky po elektroporaci ihned přenést do vytemperovaného (37 °C) TYM média s agarem a s přidáním penicilinem (1000 U/ml) (Sigma) a amikacinem (250 U/ml) (Sigma). Trichomonády uchovávat při 37 °C.
- 8) Po 4 hodinách přidat geneticin (200 µg/ml) (Sigma) pro selekci pozitivních trichomonád.
- 9) Dobře narostlé trichomonády okovat do 10 ml zkumavek s médiem TYM bez agaru a selektovat pomocí geneticinu (G 418; 200 µg/ml) (Sigma).

#### 4.3.7.2 Kmen Tv 10-02 MR 100

- 1) Sterilně odstát 250 ml rezistentních trichomonád při 1200 x g, 15 minut a 4 °C.
- 2) Odsát médium, zvážit pelet a na každý gram přidat 0,3 ml TYM média bez agaru.
- 3) Buňky resuspendovat a 4 x protáhnout přes 23G jehlu.
- 4) Do 4 mm kyvety (Bio-Rad) napipetovat 300 µl suspenze buněk a 30 µl plasmidu.
- 5) Nechat kyvety chvíli stát na ledu.
- 6) Elektroporovat buňky při časové konstantě 175 ms a 350 V (Bio-Rad).
- 7) Buňky po elektroporaci ihned přenést do 10 ml širokých sklených zkumavek s vytemperovaným TYM médiem pro rezistentní trichomonády s agarem, s penicilinem (1000 U/ml) a amikacinem (250 U/ml). Zkumavky uchovávat při 37 °C.
- 8) Po 24 hodinách přenést buňky do prvního TYM média pro rezistentní trichomonády s agarem a přidat geneticin (na výslednou koncentraci 200 µg/ml pro selekci pozitivních trichomonád) a cystein (na výslednou koncentraci 2 g/l). Trichomonády okovat každých 24 hodin a selektovat pomocí geneticinu.



### 4.3.8 Frakcionace trichomonád

Pro ur ení lokalizace PFOD v bu kách transformovaných trichomonád byla pouffita následující metoda p ípravy subcelulárních frakcí:

- 1) Nap stovat 0,5 l kultury trichomonád.
- 2) Bu ky sto it p i 1200 x g, 10 minut, 4 °C.
- 3) Bu ky 1x promýt ve fyziologickém roztoku (9 g NaCl; 1000 ml destilovaná voda) a 1x v izola ním médiu (IM médium; 77 g sacharosa; 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,42 g Tris, 1,49 g KCl, 10 ml 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, 10 ml EDTA, destilovaná voda do 1000 ml, pH 7,2). Ke sto eným bu kám p idat 10 ml IM média a bu ky d kladn rozsuspendovat.
- 4) P idat inhibitory proteáz 20 l TLCK (trypsin inhibitor *N*- *p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-HCl; 25 mg/ml) a 20 l leupeptinu (5 mg/ml).
- 5) Suspenzi 10 minut probublat dusíkem.
- 6) Bu ky sonikovat 3 - 5x 1 minutu s pulsy 1 sekunda a amplitudou 40 (sonikátor Vibra Cell<sup>TM</sup> 72405, Bioblock scientific). Po každé sonikaci suspenzi promíchat a zkontrolovat pod mikroskopem.
- 7) Odebrat 100 l sonikátu jako kontrolní vzorek.
- 8) Bu ky sto it p i 800 x g, 10 minut a 4 °C. Pelet uschovat jako kontrolní vzorek.
- 9) Supernatant dále sto it p i 22 820 x g, 30 minut a 4 °C v ultracentrifuze Beckman Optima L-90K, rotor Ti 50.2.
  - a) LGF (large granular fraction) obsahující mj. hn dé hydrogenosomy opatrn o istit od bílých lysozom odsátím, 2 x promýt v 1 ml IM média s 10% glycerolem a inhibitory proteáz TLCK a leupeptin a uschovat v -80 °C.
  - b) Cytoplasmu sto it v centrifuze Beckman rotor Ti 50.2 p i 184 000 x g, 45 minut, 4°C.
- 10) Vzorky denaturovat se vzorkovým puřrem pro SDS elektroforézu 5 minut ve vroucí vod a ov it expresi rekombinantního proteinu pomocí SDS elektroforézy, Western blotu a specifických protilátek.

### 4.3.9 Detekce protein pomocí Western blottingu

Proteiny byly rozděleny na základě molekulových hmotností na elektroforéze ve vertikálním polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (s dodecylsulfátem sodným) a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (semi dry systém BIOMETRA, 1.5 mA/cm<sup>2</sup> membrány, 60 minut). Membrána byla blokována 2 hodiny při laboratorní teplotě přes noc při 4 °C v blokovacím roztoku (10 g nízkotučné sušené mléko (Laktino), 100 ml PBS, 250 μl TWEEN 20 (MP Biomedicals, Inc)). Proteiny byly detekovány pomocí specifických protilátek a výsledný signál byl vyvolán pomocí alkalické fosfatázy (ICN/CAPPEL). Pro detekci proteinů byly použity následující protilátky:

Rekombinantní proteiny obsahující HA tag, respektive His tag byly detekovány myšičí monoklonální anti-HA (Exbio), respektive anti His (Qiagen) protilátkou (ředění 1:2 000, inkubační doba 1 hodina). Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita anti-myšičí protilátka (Sigma) konjugovaná s alkalickou fosfatázou (1:2 000; inkubační doba 1 hodina). Jako primární protilátka pro imunofluorescenci byla použita myšičí protilátka proti hemagglutininovému zrnaení (1:100 000, inkubační doba 1 hodina) a králičí protilátka proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu (1:1 000, inkubační doba 1 hodina). Sekundární protilátky pro imunofluorescenci byly značeny ALEXA FLUOR 488 (Invitrogen) proti myšičí monoklonální primární protilátce (1:1 000, inkubační doba 1 hodina) a ALEXA FLUOR 594 (Invitrogen) proti králičí primární protilátce (ředění 1:1 000, inkubační doba 1 hodina). DNA byla označena DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) (Vector laboratories) obsaženým v montovacím médiu Vecta-shield. PFOD byla detekována specifickou králičí polyklonální protilátkou připravenou firmou Eurogentec (ředění 1:500). Jako sekundární protilátka byla použita anti-králičí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ředění 1:2 000, inkubační doba 1 hodina). PFOA a B1 byly detekovány specifickou myšičí monoklonální protilátkou (poskytnuta prof. G. Brugerollem, Univerzita Blaise Pascala, Francie) (ředění 1:750, inkubační doba 1 hodina). Jako sekundární protilátka byla použita anti-myšičí protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (ředění 1:2 000, inkubační doba 1 hodina).

### 4.3.10 Detekce PFOD nep ímou imunofluorescencí

#### Fixace:

- 1) Kulturu transformovaných trichomonád nechat p ílnout na silanizovaná podlovní skla (silanizace pomocí 2% 3-aminopropyltriethoxysilanu (Sigma) v acetonu) v inkuba ní vlhké kom rce p í 37 °C po dobu 20 minut.
- 2) Bu ky fixovat ve vychlazeném (-20 °C) metanolu 5 minut a potom permeabilizovat 5 minut ve vychlazeném (-20 °C) acetonu.
- 3) Preparáty nechat zaschnout.

#### Zna ení protilátkami:

- 1) Preparáty blokovat v blokovacím pufru pro imunofluorescenci (0,25% hov zí sérový albumín (Sigma), 0,25% fletatina (Sigma), 0,25% TWEEN 20 (Sigma), 50 ml PBS, pH 7,2) 1 hodinu ve vlhké kom rce.
- 2) Inkubovat v blokovacím pufru s primární my-í protilátkou proti hemagglutininovému zna ení (1:100 000) a s primární králi í protilátkou proti hydrogenosomálnímu jable nému enzymu (1:1 000) 1 hodinu ve vlhké kom rce.
- 3) Preparáty promýt 3 x 5 minut v PBS.
- 4) Inkubovat v blokovacím pufru se sekundární protilátkou zna enou ALEXA FLUOR 488 proti my-í primární protilátce (1:1 000) spole n se sekundární protilátkou zna enou ALEXA FLUOR 594 proti králi í primární protilátce (1:1 000) 1 hodinu ve vlhké kom rce.
- 5) Preparáty promýt 3 x 5 minut v PBS.
- 6) Preparáty zalít médiem Vecta-shield s DAPI (Vector laboratories) pro zna ení jaderné DNA a p ekrýt krycím sklí kem.

Preparáty byly prohlíženy konfokálním fluorescen ním mikroskopem (Leica). Obraz získaný z mikroskop byl zpracován programem Adobe Photoshop (Adobe) a ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## 4.4 Kvantitativní Real Time PCR

### 4.4.1 Izolace RNA pomocí Trizolu Reagent

- 1) Stožit 10 ml kultury trichomonád při 1 000 x g, 15 minut, 4 °C.
- 2) Přenést pelet do DEPC mikrozkuřavky (Dietylpyrokarbonátová látka pouříváná k inaktivaci enzym RNáz), rozsuspendovat ho v 1 ml Trizolu Reagent (Total RNA Isolation Reagent, Gibco BRL) a ve inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě .
- 3) Do reakce přidat 200  $\mu$ l chloroformu, krátce promíchat v ruce a inkubovat 3 minuty při laboratorní teplotě .
- 4) Stožit při 11 500 x g, 15 minut, 4 °C.
- 5) Odebrat horní bezbarvou fázi obsahující RNA a přenést ji do mikrozkuřavky.
- 6) Přidat 0,5 ml izopropanolu, promíchat a smíř inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě .
- 7) Stožit při 11 500 x g, 15 minut, 4 °C.
- 8) Supernatant odsát, pelet promýt v 1 ml 75% etanolu.
- 9) Zvortexovat a stožit při 7500 x g, 5 minut, 4 °C, odsát etanol a sušit cca 30 minut, dokud se veřkerý etanol nevypaří.
- 10) Pelet rozpustit ve 40  $\mu$ l vody bez RNáz a inkubovat 10 minut při 55 °C.
- 11) Změřit koncentraci RNA na Nanodropu 1000 V3.3.0. a odebrat 1  $\mu$ l RNA pro kontrolní PCR reakci.

### 4.4.2 Překřídění RNA pomocí DnaseI (Rnase free, Fermentas)

- 1) Na 10  $\mu$ l reakce: total RNA .....1 ng  
10x reakční puřr s MgCl<sub>2</sub>.....1  $\mu$ l  
DnaseI.....1  $\mu$ l  
Voda bez RNáz.....do 10  $\mu$ l
- 2) Smíř inkubovat 30 minut při 37 °C.
- 3) Přidat 1  $\mu$ l (na 10  $\mu$ l reakce) 25 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a inkubovat 10 minut při 65 °C.
- 4) Odebrat 1  $\mu$ l vzorku pro kontrolní PCR ověřující istotu RNA.
- 5) Ověřit istotu RNA na horizontální elektroforéze na 1% agarózovém gelu.

#### 4.4.3 Syntéza cDNA (Invitrogen)

- 1) MIX A: oligodTprimer (15mer 500 g/ml)..... 1 1  
10 mM dNTP..... 1 1  
total RNA.....10 1
- 2) Inkubovat 5 minut p i 65 °C.
- 3) Rychle zchladit na ledu a naplno sto it.
- 4) P idat k MIXu A: 5x first strand buffer .....4 1  
0,1 M DTT.....2 1  
Rnasin.....1 1
- 5) Mírn promíchat a inkubovat 2 minuty p i 42 °C.
- 6) P idat 1 1 Superscript® II (Invitrogen)
- 7) Inkubovat 50 minut p i 42 °C.
- 8) Inaktivovat 15 minut p i 70 °C (cDNA je p ipravena na real time PCR).

Primery pro kvantitativní Real Time PCR byly navrženy pomocí programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Funk nost primer (Tab. 3) byla nejprve ov ena na genomové DNA *T. vaginalis* T1 pomocí PCR reakce (Tab. 5), netvo í-li dimery. ístota RNA a cDNA byla ov ena taktéfl pomocí PCR reakce (Tab. 5). Jako referen ní gen pro tuto metodu byl vybrán -tubulin (gene number TVAG\_456920).

**Tab. 3:** Použití primery pro amplifikaci fragment na qRT PCR.

|          |  |
|----------|--|
| PFO A    | F 5' GCTGCCACATCAGTTGCTTA 3'<br>R 5' ATGTTCTTGCGTCCCTGAGC 3' |
| PFO B1   | F 5' TTATCGACCAGAAGGCTCTC 3'<br>R 5' CTCTGGGTGTTCTGTGATGA 3' |
| PFO B2   | F 5' CGCTACTTCTGTCGCATACC 3'<br>R 5' GGGCACATTTACCAACAAT 3'  |
| PFO C    | F 5' TCGCTACAGGTGCTGATGTC 3'<br>R 5' GGTCCTTCTTCGGCTTATCC 3' |
| PFO D    | F 5' CTGGCTCAAGGTCACAGACA 3'<br>R 5' GCCTTGACACCTTCTCTTGC 3' |
| PFO E    | F 5' GAAGTCCATCGCCAAGACAT 3'<br>R 5' ATACCACGCTTCTCCCATTG 3' |
| PFO F    | F 5' CACGCTCACTCATTTCCTCA 3'<br>R 5' GCTTCGAGTTCCTTTTGTGG 3' |
| -tubulin | F 5' TCGTATCCTCTCCACATACT 3'<br>R 5' GTGTTGTGAGCTTGAGTGTA 3' |

V-echny reakce byly pro kvantitativní RT PCR míchány v triplikátech.

**Tab. 4:** Master mix na 3,5 reakce (1 reakce 10 l) pro každý jeden gen:

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| destilovaná voda          | 13,3 l |
| SYBR <sup>®</sup> green I | 17,5 l |
| cDNA                      | 1,4 l  |
| F primer                  | 1,4 l  |
| R primer                  | 1,4 l  |

**Tab. 5:** qRT PCR probíhala na p ístroji LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche) podle programu:

| Krok            | Teplota (°C) | Doba trvání | Po et opakování |
|-----------------|--------------|-------------|-----------------|
| Preinkubace     | 95           | 10 minut    | 1               |
| Denaturace      | 95           | 10 vte in   | 50              |
| Nasedání primer | 59           | 12 vte in   | 50              |
| Syntéza         | 72           | 30 vte in   | 50              |
| Chlazení        | 40           | 0           |                 |

## 4.5 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs)

Pro pokusy s KORs byly purifikovány hydrogenosomy z parentních buněk Tv 10-02 a rezistentních buněk trichomonád Tv 10-02 MR 100. Postup purifikace hydrogenosom z trichomonád kmene Tv 10-02 viz strana 48 (krok 1 - 9a).

### 4.5.1 Purifikace hydrogenosom z rezistentních trichomonád

Hydrogenosomy rezistentních trichomonád byly purifikované pomocí izopyknicke centrifugace na gradientu Percollu (Sigma).

- 1) Krok 1 - 9a viz strana 48.
- 2) Připravte LGF (large granular fraction obsahující mimo jiné i hydrogenosomy):

Připravte roztok 45% Percollu:

|         |   |
|---------|---|
| 18 ml   | 2 x ST pufru (500 mM sacharóza, 20 mM Tris, 1 mM KCl, pH 7,2) |
| 16,2 ml | Percoll   |
| 1,8 ml  | H <sub>2</sub> O  |

LGF přeneste do OptiSeal Beckman zkumavky, doplňte 45% Percollem po okraj a několikrát lehce promíchejte.

- 3) Stáhněte v centrifuzě Beckman v rotoru VTi-50 při 67 000 x g, 30 minut, 4 °C.
- 4) Po státní opatrně odeberte fázi bílých tělních hydrogenosom (níže ze dvou hlavních oddělených populací organel, horní fáze odpovídá lysozomům) a 2x ji promývejte v 1 ml 1x ST pufru (Sucrose Tris Buffer; 250 mM sacharóza, 10 mM Tris, 0,5 mM KCl, pH 7,2) a poté v 1 ml 1x ST pufru s 10% glycerolem a s inhibitory proteáz 2 ml TLCK a 2 ml leupeptinu.
- 5) Připravené hydrogenosomy jsou připravené pro pokusy a zamražení v -80 °C.

## 4.5.2 Solubilizace trichomonád a hydrogenosom pro detekci KORs

Postup solubilizace celých buněk trichomonád\*:

- 1) Stožit 100 ml buněk Tv 10-02 i Tv 10-02 MR 100 při 2 000 x g, 5 minut, 4 °C.
- 2) Pelet 4 x zmrazit a rozmrazit pomocí tekutého dusíku a vlažné vody.
- 3) Pelet rozsuspendovat ve 400  $\mu$ l Anaerobního pufru (50 mM HEPES, 200  $\mu$ M TPP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7,5) s 0,5% oktylglukosidem (ICN Biomedicals).
- 4) Inkubovat 25 minut na ledu za občasného promíchání.
- 5) Stožit buňky při 200 000 x g, 25 minut, 2 °C (supernatant uschovat pro případnou pozdější analýzu).
- 6) Pelet rozsuspendovat ve 150  $\mu$ l Anaerobního pufru s 1% Tritonem X-100.
- 7) Inkubovat 25 minut na ledu a občas promíchat.
- 8) Stožit při 200 000 x g, 25 minut, 2 °C (supernatant uschovat jako zdroj enzym KOR 1).
- 9) Pelet rozsuspendovat ve 150  $\mu$ l Anaerobního pufru s 1 M octanem sodným (10 mM fosfátový pufr, 1 M octan sodný, 1 mM EDTA, pH 7,4).
- 10) Inkubovat 25 minut na ledu a občas promíchat.
- 11) Stožit při 200 000 x g, 25 minut, 2 °C (supernatant uschovat jako zdroj enzym KOR 2).

\* Solubilizace hydrogenosom začínala u bodu 6. Další postup byl stejný jako u celých buněk.

Vzorky byly smíchány s neredukujícím vzorkovým pufrem pro nativní elektroforézu (bez SDS) a proteiny byly separovány na 8% vertikálním polyakrylamidovém gelu bez SDS (akrylamid:bisakrylamid poměr 37,5:1) (aparatura MiniProtean II, Bio-Rad) při konstantním napětí 120 V, 4 hodiny a 4 °C. Po ukonění separace byl gel vložen do exikátoru a promyt v Anaerobním pufru bez  $\beta$ -merkaptoetanolu. Poté byl gel inkubován ve tmě s Anaerobním pufrem bez  $\beta$ -merkaptoetanolu s 10 mM indolpyruvátém (Sigma), 200  $\mu$ M CoA (Sigma) a 2 mg/ml nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma). Přítomnost aktivity byla prokázána vytvořením nerozpustného modrého formazanu (redukovaný produkt NBT) v gelu.



### 4.5.3 Měření enzymatických aktivit

Aktivity enzymů byly měřeny spektrofotometricky pomocí UV-1601 spektrofotometru (Shimadzu) a vizualizovány programem UVProbe.

#### 4.6.3.1 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO)

PFO byla stanovena ve speciálních anaerobních kyvetách se dvěma postranními raménky pro umístění proteinového vzorku a hem probublávání kyvety dusíkem. Reakční směs v kyvetě byla tohoto složení:

- 2 ml PFO pufru (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ )
- 50  $\mu\text{l}$  100 mM methylviologenu (MV) (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  100%  $\beta$ -merkaptoetanolu (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M pyruvátu (Sigma) (vždy první)
- 50  $\mu\text{l}$  200 M koenzymu A

Do jednoho raménka byl odměřen přesný objem měřeného proteinového vzorku s 1% roztokem Tritonu X-100. Kyveta byla 10 minut probublána dusíkem. PFO byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm po smíchání proteinového vzorku s reakční směsí. Změna absorbance byla odečtena z křivky průběhu reakce. Aktivita PFO byla měřena také s indolpyruvátem (20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M), a to za stejných podmínek jako s pyruvátem.

Aktivita PFO (množství mol substrátu přeměněných jedním mg proteinu za 1 minutu) byla vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu pro methylviologen  $\epsilon_{600} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.6.3.2 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza D (PFOD)

Aktivita PFOD byla stanovena za stejných podmínek jako aktivita PFO. Měření aktivity probíhalo s těmito substráty:

- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M pyruvátu
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M indolpyruvátu (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M fenyropyruvátu (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M  $\alpha$ -ketobutyrátu (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M  $\alpha$ -ketoglutamátu (Sigma)
- 20  $\mu\text{l}$  1 ~ 0,7 M  $\alpha$ -ketomalonátu (Sigma)

Dále byla provedena analýza UV/Vis spektra rekombinantní PFOD na UV-1601 spektrofotometru (Shimadzu). Spektrum bylo měřeno v rozsahu 250 až 700 nm.

#### 4.6.3.3 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs)

KORs byly stanovovány jak za anaerobních podmínek s methylviologinem, a to stejným způsobem jako PFO, tak v aerobních kylvetách s nitro blue tetrazoliem (NBT) a indolpyruvátém.

Reakční směs v kylvetě obsahovala: 2 ml 100 mM PFO pufru

2 mg/ml NBT

10 až 15 mM indolpyruvátu

5 až 125% Tritonu X-100

Aerobní měření probíhalo bez probublávání dusíkem. KORs byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm po smíchání proteinového vzorku s reakční směsí a změna absorbance byla odečtena z křivky průběhu reakce.

#### 4.6.3.4 Malic enzym

Aktivita malic enzymu (ME) byla měřena za aerobních podmínek při vlnové délce 340 nm.

Reakční směs v kylvetě obsahovala: 2 ml IM média

50 až 11M L-malátu (Sigma)

20 až 100 mM NAD (Sigma)

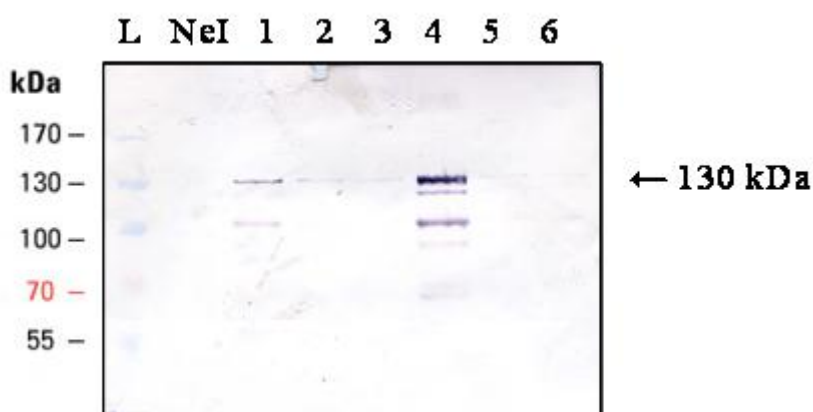
5 až 10% Tritonu X-100

Reakce byla zahájena přidáním hydrogenosomálního vzorku s 1% Tritonem X-100. Hodnota změny absorbance byla odečtena z křivky průběhu reakce.

## 5 Výsledky

### 5.1 Expese PFOD v *E. coli*

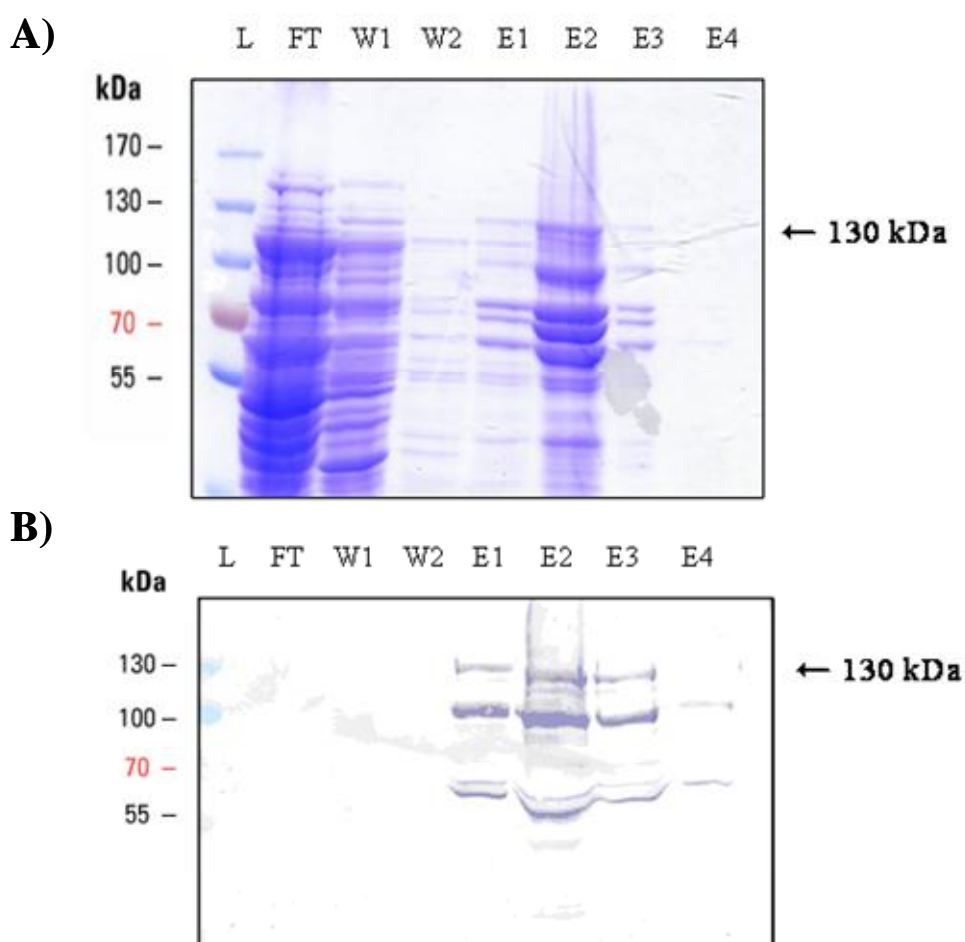
Gen *pfod* bez signální sekvence byl zaklonován do expresního plasmidu pET-42b+ obsahujícího 6x His tag na 3' konci. Histidiny se váží s velkou afinitou na nikl, což umožní uje purifikaci proteinu pomocí afinitní chromatografie. Tímto konstruktem byly transformovány expresní buňky *E. coli* BL 21 (DE3) a BL 21 (GroES/EL). Po transformaci bylo několik klonů bakterií otestováno na přítomnost plasmidu s inzertem pomocí PCR. Pozitivní klony byly použity pro test exprese *pfod* za anaerobních podmínek (viz str. 43). Míra exprese jednotlivých klonů byla analyzována pomocí imunoblotu (obr. 15). Z obrázku 15 je patrné, že klon 4 indukovaný pomocí IPTG (Isopropyl -D-1-thiogalaktopyranosid) exprimoval protein požadované velikosti (znázorněno šipkou) nejlépe, proto byl vybrán pro aerobní a anaerobní kultivaci (viz str. 43). Výťažnost proteinu z anaerobní kultivace byla oproti aerobní podstatně menší (příbližně 10% z aerobní), avšak docházelo k podstatně menšímu rozpadu rekombinantního enzymu v bakteriích *E. coli*. Nejlepší exprese za anaerobních podmínek bylo dosaženo při indukci klonu 4 s terminálním akceptorem elektronů dusíkatým sodným ( $\text{NaNO}_3$ ), byl proto vybrán pro anaerobní kultivaci v objemu 2 l.



**Obr. 15: Analýza 6ti klonů *E. coli* pro ověření exprese rekombinantního proteinu PFOD pomocí Western blotu a specifické protilátky proti His tagu. Vysvětlivky: L, hmotnostní standardy; NeI, neindukované buňky; 1 - 3, klony *E. coli* BL 21 (GroES/EL); 4 - 6, klony *E. coli* BL 21 (DE3).**

### 5.1.1 Purifikace PFOD

Z bakteriální kultury byl rekombinantní protein PFOD izolován pomocí afinitní purifikace na kolon s náplní Ni-NTA agarózy za nativních podmínek. Protein byl z kolony eluován pomocí nespojitého gradientu pufr se zvyšujícím se obsahem imidazolu (10 mM a 250 mM). Na obrázku 16 jsou znázorněny jednotlivé izolované frakce obsahující rekombinantní PFOD. Nejvíce proteinu bylo obsaženo ve frakci E2, která byla použita pro měření enzymatické aktivity a k analýze UV/Vis spektra rekombinantní PFOD. Molekulová hmotnost proteinu byla stanovena pomocí kapalinové chromatografie na molekulárním sítu (viz níže, obr. 18, 19).

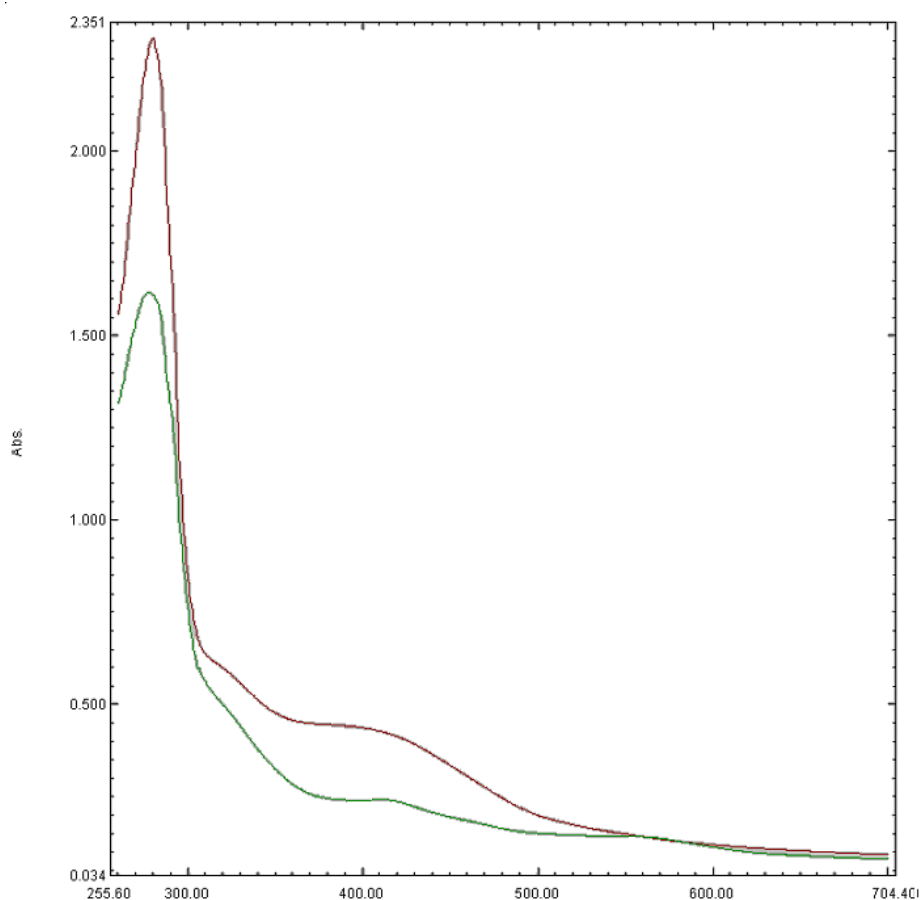


**Obr. 16: Izolace rekombinantního proteinu PFOD na kolon s Ni-NTA agarózou. A)** SDS elektroforéza (10% gel) znázorující jednotlivé frakce a množství proteinu, které je v nich obsaženo. *Výsledek:* L, hmotnostní standardy; FT, flow through; W 1, 2, wash (promytí) 1, 2; E 1 až 4, elution (eluce) 1 až 4. **B)** Western blot znázorující přítomnost rekombinantního proteinu PFOD v jednotlivých izolovaných frakcích. Proteiny byly vizualizovány pomocí anti-His

protilátky. Tato protilátka rozpoznávala i proteiny o nižší molekulové hmotnosti než 130 kDa, což je patrné u rozpadlý protein PFOD.

### 5.1.2 Rekombinantní PFOD obsahuje Fe-S skupiny

Absorpční optické spektrum rekombinantního proteinu PFOD bylo analyzováno spektrofotometricky pomocí UV-1601 spektrofotometru (Shimadzu) a vizualizováno programem UVProbe. Spektrum bylo měřeno v rozsahu 250 až 700 nm. Na obrázku 17 je červeně znázorněno spektrum enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO) purifikovaného v aktivním stavu z hydrogenosom *T. vaginalis* a zeleně je vyobrazeno spektrum rekombinantního proteinu PFOD. Z obrázku je zřejmé, že obě spektra mají podobný průběh. Indikativní je především oblast mezi cca 350 - 500 nm, kde absorbují Fe-S skupiny. Dá se tedy usuzovat, že rekombinantní PFOD obsahuje Fe-S skupiny typické pro PFO.



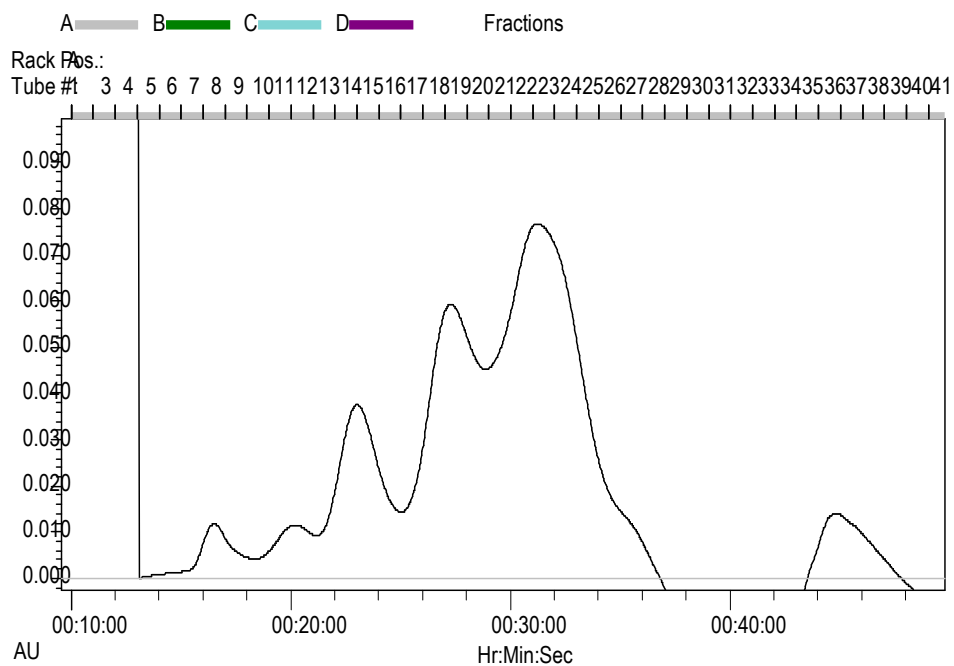
**Obr. 17: Spektrum rekombinantního proteinu PFOD (zeleně) v porovnání se spektrem PFO (červeně). Přibližné množství měřeného proteinu ve vzorku bylo cca 1.5 mg/ml.**

### 5.1.3 Rekombinantní PFOD neredukuje methyl viologen na ú et vybraných elektronových donor

Aktivita PFOD byla m ena spektrofotometricky pomocí UV-1601 spektrofotometru (Shimadzu) p í vlnové délce 600 nm a vizualizována programem UVProbe. Aktivita byla stanovována anaerobn s akceptorem elektron methyl viologenem ve speciálních kyvetách. Aktivita PFOD byla m ena jak s šklasickýmõ substrátem pro PFO pyruvátem, tak s šalternativnímiõ substráty indolpyruvátem, fenylpyruvátem, oxalacetátem, -ketoglutarátem, -ketomalonátem a -ketobutyratem. Rekombinantní PFOD neredukovala methyl viologen s řádným z vybraných elektronových donor .

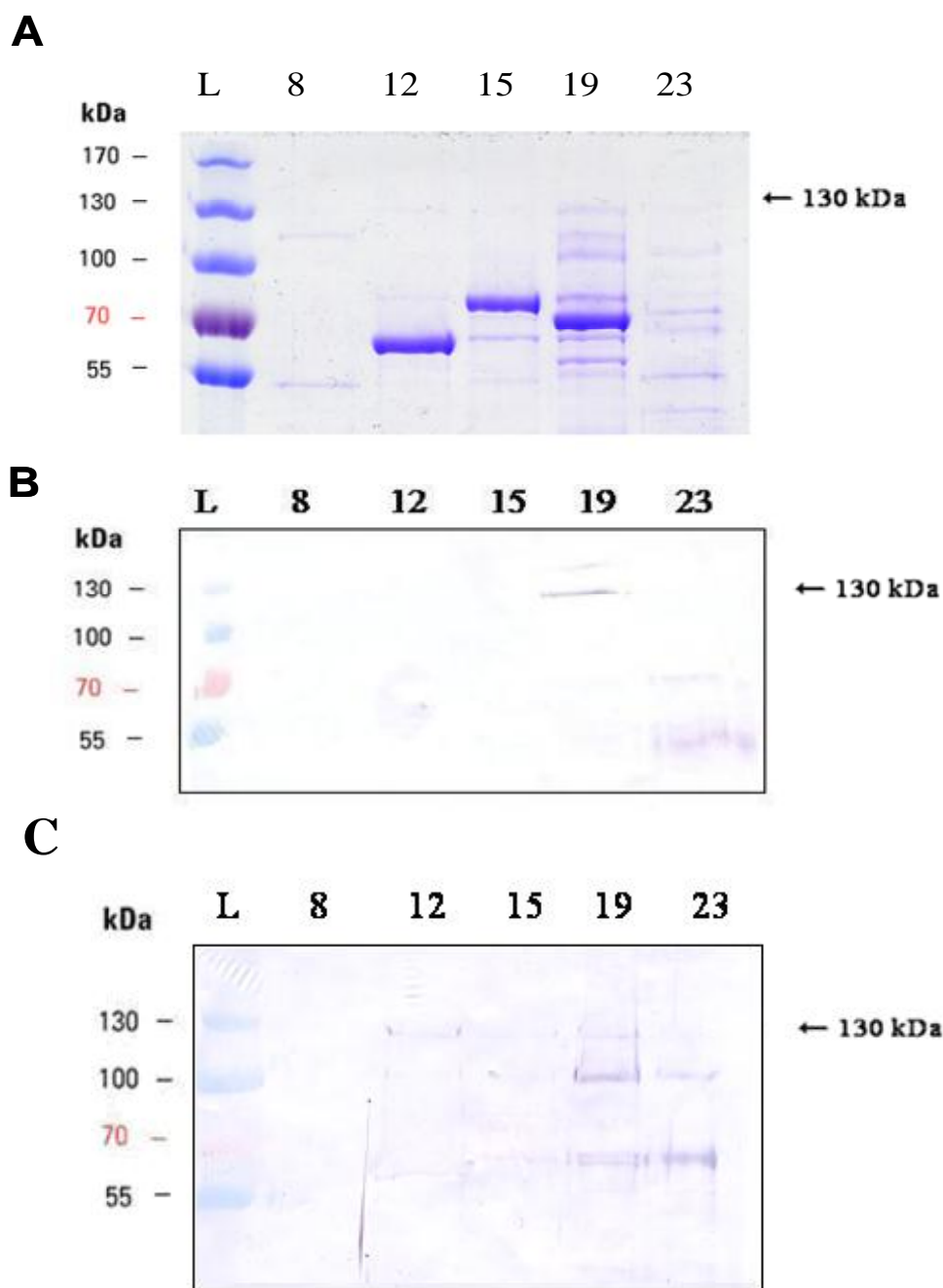
### 5.1.4 Stanovení nativní molekulové hmotnosti PFOD

PFOD byla na SDS elektroforéze a Western blotu detekována jako protein o velikosti 130 kDa (nap . obr. 16). Za ú elem zjistit, zdali protein PFOD tvo í funk ní dimer jako PFO *T. vaginalis*, jsme stanovili nativní molekulovou hmotnost rekombinantní PFOD izolované z *E. coli* pomocí kapalinové chromatografie na molekulárním sítu (kolona Superdex 200). Na obrázku 18 je znázorn n elu ní profil PFOD z kapalinové chromatografie. Z obrázku je patrné, ře nejvíce protein bylo eluováno v 8., 12., 15., 19. a 23. frakci. Na obrázku 19A je znázorn na SDS elektroforéza (10% gel) s elu ními frakcemi 8, 12, 15, 19 a 23. Na obrázku 19B je Western blot s elu ními frakcemi a s protilátkou proti polyhistidinovému zna ení. Na obrázku 19C je na Western blotu vizualizovaná stejná situace av-ak s pouřitím anti PFOD protilátky. Molekulová hmotnost rekombinantní PFOD stanovená pomocí SDS-PAGE byla p íblifn 130 kDa (obr. 16A). Vypo tená molekulová hmotnost protein ve frakci 15 byla cca 330 kDa odpovídající multimér m protein .



**Obr. 18: Elu ní profil protein z kapalinové chromatografii na molekulárním sítu.**

Vrcholy znázorují elu ní frakce (8, 12, 15, 19 a 23) obsahující proteinové vzorky. Na elu ní profilu protein jsou patrné vrcholy odpovídající multiméram PFO v frakce 12 a 15.



**Obr. 19:** A) SDS elektroforéza (10% gel) a Western bloty znázorující frakce 8, 12, 15, 19 a 23 z kapalinové chromatografie vizualizované pomocí anti His (B), respektive anti PFOD protilátky (C). Typkou je znázorněna předpokládaná molekulová hmotnost overexprimované PFOD. Na obrázku 19B je na Western blotu přítomna rekombinantní PFOD pouze ve frakci 19. Abundantní proteiny protilátka nedetekuje, přesto je jsou jasně patrné na SDS elektroforéze i na Western blotu s anti PFOD protilátkou. Toto je patrné způsobem rozpadem PFOD a ztrátou His tagu během izolace.

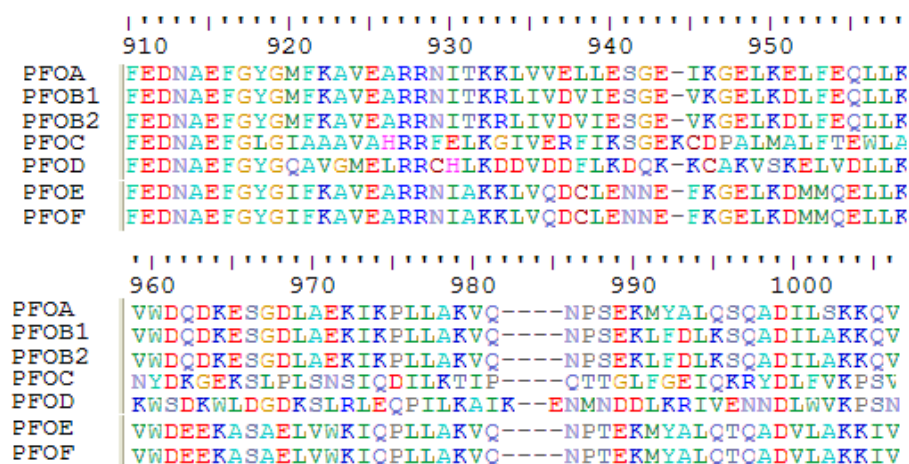


## 5.2 Exprese rekombinantní PFOD v *S. cerevisiae*

Cílem tohoto pokusu byla exprese PFOD v eukaryotickém systému. Gen *pfod* bez importní sekvence byl zaklonován do expresního kvasinkového vektoru pYM-N23. Na 3' konec *pfod* genu byla zařazena specifická sekvence 6x His tagu (CACCACCACCACCAC). Tímto konstruktem byly transformovány expresní buňky *S. cerevisiae* kmene YPH499. Pro transformaci buněk byl použit také prázdný vektor pYM-N23, který sloužil jako negativní kontrola. Pozitivní klony kvasinek byly použity pro test exprese PFOD. Kvasinky byly kultivovány aerobně v tekutém YPGal médiu při 30 °C po dobu 7 dní. Každých 24 hodin byly odebírány kontrolní vzorky. U všech vzorků byla ověřena exprese PFOD pomocí imunoblotu. Exprese PFOD tímto systémem však nebyla ani u jednoho testovaného klonu úspěšná.

## 5.3 Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu specifické protilátky

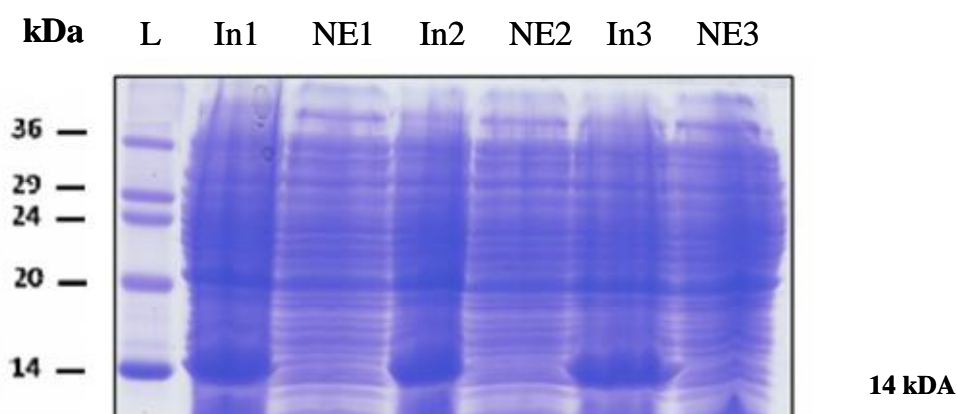
Za účelem získání polyklonální protilátky proti PFOD *T. vaginalis* byl gen PFOD porovnán s ostatními PFO paralogy z *T. vaginalis* pomocí programu ClustalX (obr. 20) a byla vybrána sekvence inzertu z nekonzervativní oblasti PFOD. Molekulární hmotnost peptidu byla 14 kDa.



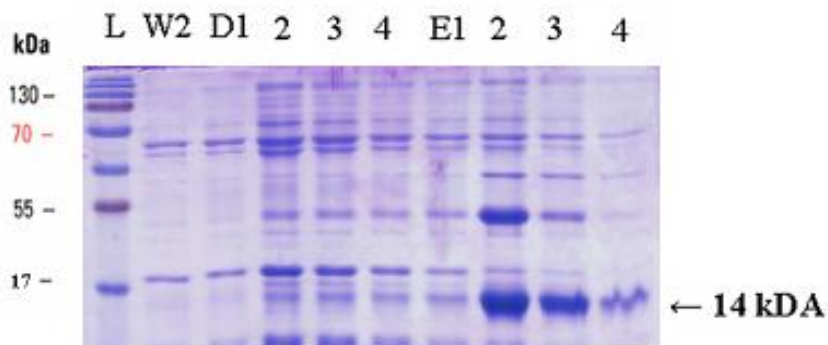
**Obr. 20: Výřez z alignmentu sekvencí PFOA a PFOB1 v programu ClustalX.** Z prostorových diagramů je zde zobrazena pouze část, která obsahuje sekvenci inzertu z nekonzervativní oblasti PFOD.

Pofladovaný inzert byl vložen do expresního vektoru pET-42b+ obsahující 6x His tag. Tímto konstruktem byly transformovány bučky *E. coli* kmene BL21 (DE3). Některé klony bakterií byly použity pro test exprese. Klon 1 na obrázku 21 byl vybrán pro kultivaci v objemu 3 l stejného LB média.

Cílový rekombinantní his-tagovaný protein byl izolován z bakterií afinitní purifikací na koloně s Ni-NTA agarózou za denaturačních podmínek (8 M močovina) pomocí specifického pufru se snižujícími se hodnotami pH dle doporučeného protokolu výrobce (Qiagen). Přítomnost rekombinantního proteinu v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE (obr. 22). Z obrázku je patrné, že nejvíce proteinu je obsaženo ve frakci E2 a E3. Tyto frakce byly rozdělány podle molekulové hmotnosti na 15% preparativní SDS-PAGE. Protein o předpokládané velikosti (14 kDa) byl vyizolován, promyt v PBS a poslán do firmy Eurogentec (Belgie) jako antigen pro imunizaci dvou králíků.



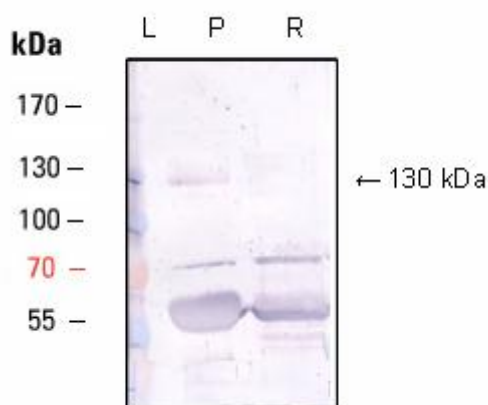
**Ob. 21. Analýza klonu *E. coli* pro ověření exprese proteinu pomocí SDS PAGE (15% gel).** Vysvětlivky: L, hmotnostní standardy; IN1-3, indukované klony 0,5 mM IPTG; NE1-3, neindukované klony.



**Obr. 22: Peitní rekombinantního proteinu izolovaného za denaturačních podmínek na Ni-NTA kolon . SDS-PAGE (15% gel) znázorující istotu jednotlivých frakcí a množství proteinu, které je v nich obsaženo. Vysv tlivky: L, hmotnostní standardy; W2, wash 2; D 1 ó 4; E 1 - 4, frakce obsahující izolovaný protein.**

### 5.3.1 Testování protilátky

Obdržené polyklonální antisérum bylo použito pro testování přítomnosti PFOD v hydrogenosomech *T. vaginalis* parentního kmene Tv 10-02 a rezistentního kmene Tv 10-02 MR 100. Na obrázku 23 je patrný signál v odpovídající velikosti (znázorněn šipkou) u parentního kmene trichomonád (P). U rezistentního kmene trichomonád tento signál není zřejmý (R).

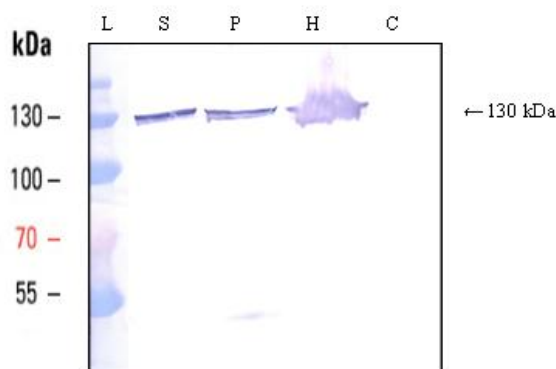


**Obr. 23: Detekce PFOD v hydrogenosomech trichomonád pomocí Western blotu a anti PFOD protilátky. Vysv tlivky: L, hmotnostní standardy; P, Hydrogenosomy parentního kmene *T. vaginalis* 10-02. Protilátka rozeznává protein v odpovídající velikosti (znázorněn šipkou)**

–ipkou) i proteiny nižší velikosti (cca 70 a 65 kDa), signál o velikosti 65 kDa patří jable němu enzymu; R, Hydrogenosomy rezistentního kmene Tv 10-02 MR 100. Protilátka nerozeznává band v odpovídající velikosti, pouze proteiny s nižší molekulovou hmotností.

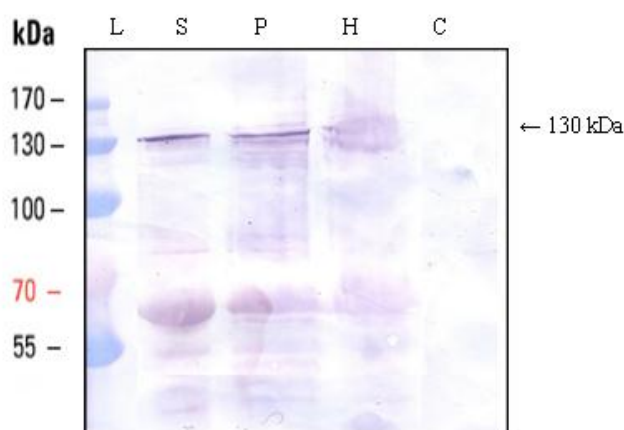
## 5.4 Lokalizace PFOD v *T. vaginalis*

Gen *pfod* bez importní sekvence byl zaklonován do expresního plasmidu TagVag obsahujícího 2x HA tag. Tímto konstruktem byly transformovány buňky trichomonád kmene T1. Trichomonády byly selektovány geneticinem. Úspěšnost transfekce byla testována po 10ti pasážích pomocí imunoblotu. Pozitivní trichomonády byly napěstovány do objemu 250 ml a byla použita metoda přípravy subcelulárních frakcí pro určení lokalizace PFOD v transformovaných trichomonádách (viz kapitola 4.3.8). Buňky byly zpracovány dle uvedeného postupu a všechny vzorky byly analyzovány na přítomnost PFOD pomocí imunoblotu. Na obrázku 24 je znázorněna lokalizace rekombinantní PFOD v jednotlivých subcelulárních frakcích transformovaných trichomonád. V celkovém buněčném lyzáátu (S) je jasně zetelný signál HA tag obsahujícího proteinu PFOD. Tento signál, protože PFOD neobsahovala hydrogenosomální signální sekvenci, je výrazně zesílen v LGF frakci, tedy hydrogenosomech. V cytoplasmě PFOD není přítomná vůbec.



**Obr. 24: Distribuce PFOD v buňkách *T. vaginalis* kmene T1 transformovaných vektorem TagVag s inzertem PFOD znázorněná pomocí Western blotu a specifické protilátky proti hemagglutininovému značení. Vysvětlivky: L, hmotnostní standardy; S, celkový lyzáát trichomonád po sonikaci; P, pelet po odstředění buněk při 800 x g; H, LGF obsahující hydrogenosomy; C, cytoplasma.**

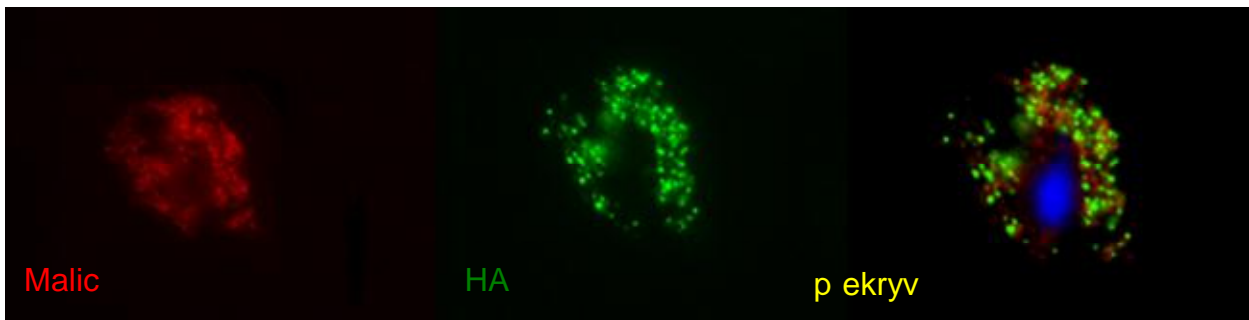
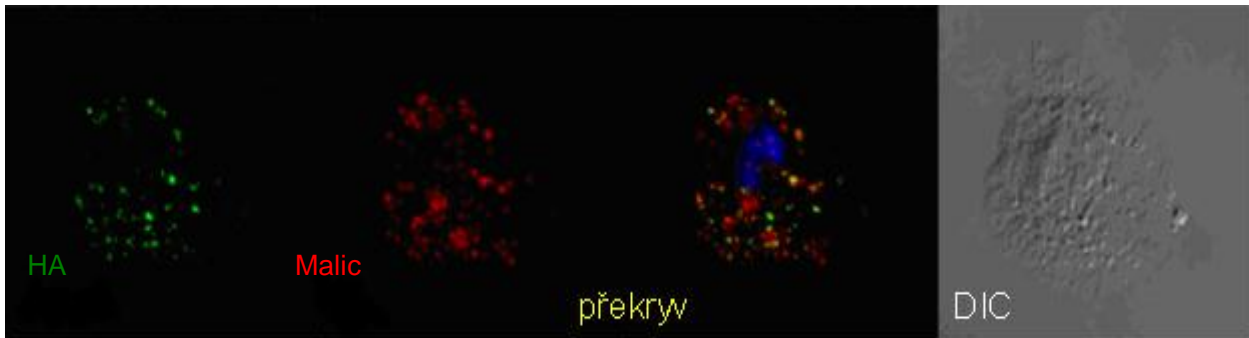
K ur ení distribuce rekombinantní PFOD v transformovaných trichomonádách kmene T1 byla také pouřita polyklonální anti PFOD protilátka. Obrázek 25 potvrzuje p ede-lý výsledek, tedy že se rekombinantní protein nachází v LGF. V cytoplasm transformovaných bun k není rekombinantní PFOD p ítomná.



**Obr. 25: Lokalizace PFOD v transformovaných bu kách *T. vaginalis* kmene T1 vektorem TagVag s inzertem PFOD bez signální sekvence znázorn ěná na Western blotu s anti PFOD protilátkou.** *Vysv ělivky:* L, hmotnostní standardy; S, celkový lyzát po sonikaci; P, pelet po sto ění bun k p í 800 x g; H, LGF obsahující hydrogenosomy; C, cytoplasma.

#### 5.4.1 Lokalizace rekombinantní PFOD v bu kách *T. vaginalis* pomocí nep ímé imunofluorescence

Lokalizace rekombinantní PFOD overexprimované v *T. vaginalis* kmene T1 byla ov ěna pomocí nep ímé imunofluorescence (obr. 26). Protein zna ěný HA tagem byl lokalizován monoklonální anti-HA protilátkou (na obrázku zelen ě). Jako hydrogenosomální marker byla pouřita protilátka proti jable ěnému enzymu (na obrázku ěerven ě). Z p ekryvu signál ě je patrné, že overexprimovaný protein PFOD je v bu ce lokalizován do hydrogenosom , což odpovídá výsledk ěm frakciona ěních experiment ěm .



**Obr. 26: Lokalizace HA-tagované PFOD v buňkách *T. vaginalis* T1 pomocí nepřímé imunofluorescence.** červený signál (znaení hydrogenosomálního jableného enzymu) kolokalizuje se zeleným signálem (znaení protein obsahující Ha tag). Buněná jádra (modře) jsou znaena DAPI. Z obrázku je zřejmé, že rekombinantní protein PFOD u *T. vaginalis* lokalizován do organely hydrogenosomu. DIC zázoruje buňky pod diferenciálním kontrastem.

## 5.5 Transformace a kultivace *T. vaginalis* kmene Tv 10-02 MR 100

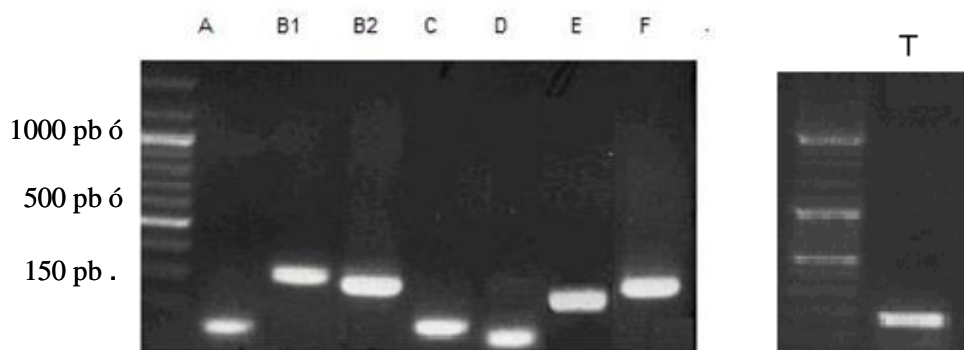
Cílem tohoto pokusu bylo studium vlivu PFOD na metronidazolovou rezistenci trichomonád a objasnění fyziologické aktivity tohoto proteinu obecně, protože rezistentní trichomonády neexprimují dominantní paralogy PFO o známé aktivitě. Předpokládala jsem, že výsledkem úspěšné exprese PFOD v homologním systému by mohl být funkční protein, protože rezistentní trichomonády mají zachovaný systém syntézy Fe-S center v hydrogenosomech. Buňky *T. vaginalis* kmene Tv 10-02 MR 100 byly transformovány vektorem TagVag s PFOD bez importní sekvence. Buňky byly zkontrolovány ihned po elektroporaci pod světelným mikroskopem a přeneseny do vytemperovaného TYM média pro rezistentní trichomonády. Kultivace probíhala při 37 °C a v médiu se zvýšeným množstvím cysteinu na dvojnásobnou koncentraci (2 g/l). Odkovávání trichomonád probíhalo každý den, a to ve stejnou hodinu, a selektovány byly pomocí geneticinu. Jako kontrola sloužily buňky transformované vektorem TagVag s hydrogenosomální procesovací peptidázou (poskytnutý Mgr. Pavel Doležalem, Ph.D.).

Transformace rezistentních trichomonád byla provedena 2x neúspěšně, kdy buňky zemřely do 24 hodin po elektroporaci. Během tohoto pokusu byl optimalizován postup elektroporace a kultivace transformovaných buněk (viz str. 48). Při následujících transformačních pokusech se podařilo trichomonády kultivovat průměrně 8 dní. Po této době došlo k úmrtí buněk v etní kontrole. Pokud byl do média přidán metronidazol (10 µg/ml), došlo k úmrtí buněk do 24 hodin. Buňky se nepodařilo převést do média bez agaru, které je nutné pro další studie (nepřímou fluorescencí a analýzu pomocí Western blotu a specifických protilátek).

## 5.6 Kvantitativní Real Time PCR

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit pomocí kvantitativní Real Time PCR relativní expresi 7 genů kódujících paralogy pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (A-F) *T. vaginalis* parentního kmene Tv 10-02 a rezistentního kmene Tv 10-02 MR 100.

Sekvence navržených primerů byla analyzována pomocí databáze BLAST na [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), jsou-li specifické pro každý daný gen. Funkčnost primerů byla ověřena pomocí PCR reakce na celkové DNA *T. vaginalis* kmene T1 (obr. 27). RNA z buněk trichomonád byla izolována pomocí Trizolu Reagent dle doporučeného protokolu výrobce (Total RNA Isolation Reagent, Gibco BRL). Kvalita vyizolovaných RNA byla zkontrolována na elektroforéze obsahující formaldehyd (vždy byly přítomny dva signály znázorňující malou a velkou ribosomální podjednotku - 18S a 28S) a na přístroji NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Výsledný poměr absorbancí měřených při vlnových délkách  $A_{260}/A_{280}$  byl vyšší než 1,8, což značí vysokou kvalitu RNA. Ověřená RNA byla přečištěna od genomové DNA pomocí DNasyI (Fermentas) a přeepsána do cDNA dle doporučeného protokolu výrobce (Invitrogen). Přítomnost DNA byla ve vzorcích ověřena pomocí PCR reakce (obr. 28) (viz str. 54).



**Obr. 27: Ověření specifity navržených primerů pro geny PFO A-F a  $\alpha$ -tubulin (T).** Z obrázku je patrné, že všechny primery tvořily pouze jeden produkt a mohly být použity pro qRT PCR. Templátem byla genomová DNA *T. vaginalis*.





**Obr. 28: Kontrola istoty RNA a cDNA pomocí PCR s primery pro  $\alpha$ -tubulin.**

Vysvětlivky: P, parentní kmen trichomonád Tv 10-02; R, rezistentní kmen trichomonád Tv 10-02 MR 100; 1., PCR produkt z izolované RNA značící přítomnost DNA; 2., absence PCR produktu po přítomnosti RNA DNase I; 3., PCR produkt z cDNA. Druhá část obrázku (4., 5., 6.) znázorňuje stejnou situaci, ale u rezistentních buněk kmene Tv 10-02 MR 100. Tato kontrola byla provedena u všech RNA a cDNA.

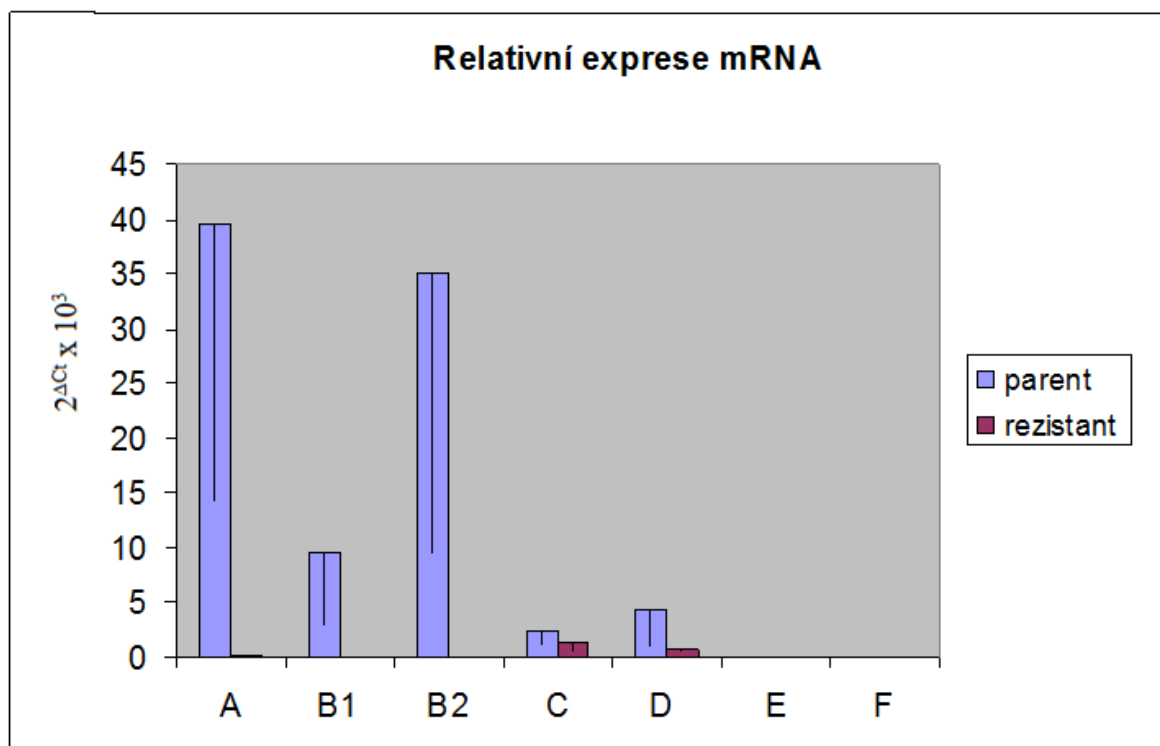
Jako referenční gen pro normalizaci výsledků byl vybrán  $\alpha$ -tubulin (gene number TVAG\_456920, <http://trichdb.org/trichdb/>). Tato volba byla založena na předpokladu stabilní exprese tohoto genu v buňkách trichomonád citlivých i rezistentních k metronidazolu. Po provedení všech výše zmíněných kontrol byly zahájeny samotné pokusy. Všechny vzorky pro RT-PCR byly míchány v triplicátech a jako negativní kontroly byly použity vzorky, které neobsahovaly cDNA. Jako fluorescenční marker byl použit SYBR<sup>®</sup> green I (Invitrogen). Toto značí se váže na dvojvláknovou DNA vznikající během PCR reakce. Dochází k emisi fluorescenčního záření, které je zachyceno detektorem, přičemž intenzita fluorescenčního signálu odpovídá množství amplifikované DNA vytvořené během PCR reakce.

Měření probíhalo na přístroji LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche) a celkem byla analyzována cDNA z pěti nezávislých izolací z parentního a rezistentního kmene trichomonád. Po ukončení PCR reakce byly na přístroji LightCycler zkontrolovány křivky táhání výsledných amplikonů, byly odečteny  $C_t$  hodnoty vzorků a použity pro výpočet relativních expresí mRNA (obr. 29).  $C_t$  hodnoty odpovídají počtu cyklů, které jsou potřebné pro dosažení předem stanovené intenzity fluorescenčního signálu (tzv. threshold, fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce).  $C_t$  hodnoty PFO genů byly standardizovány k  $C_t$  hodnotám  $\alpha$ -tubulinu, tzv.  $C_t$

( $C_t = C_t$  cílového genu  $\div C_t$  referenčního genu) a byly vypočteny relativní exprese mRNA cílových genů ( $2^{\Delta C_t}$ ), přičemž předpokládána účinnost primer byla blízká 100%.

Na obrázku 30 je znázorněn graf relativních expresí mRNA všech sedmi PFO genů. Modrá barva představuje výsledky měření u parentních trichomonád a fialová barva měření u rezistentních trichomonád. Z grafu je patrné, že PFO A, B1 a B2 trichomonád senzitivních k metronidazolu jsou na úrovni mRNA dominantně exprimovány. Avšak množství mRNA u PFOA, B1 a B2 u trichomonád rezistentních k metronidazolu bylo výrazně sníženo. Relativní exprese mRNA PFOE a F u parentních a rezistentních trichomonád byla téměř nulová a v grafu proto není viditelná.

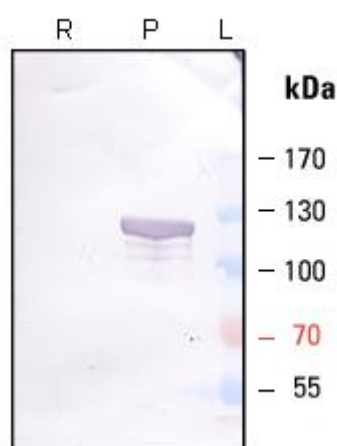
Zajímavý je výsledek u *pfoc* a *pfod*. Míra exprese mRNA těchto dvou genů u parentních trichomonád nedosahuje hodnot naměřených u PFOA a B2, ale v porovnání s ostatními vzorky je míra exprese u rezistentních trichomonád zvýšená.



**Obr. 29: Relativní exprese mRNA genů kódujících pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu A-F.** Výsledky byly normalizovány na referenční gen  $\alpha$ -tubulin. V měření byla použita cDNA z pěti nezávislých izolací z parentních a rezistentních trichomonád. Modře je znázorněn parentní kmen trichomonád Tv 10-02 a fialově rezistentní kmen Tv 10-02 MR 100. Chybové úsečky vyznačují směrdatné odchylky.

### 5.6.1 Lokalizace dominantně exprimovaných PFO v hydrogenosomech trichomonád

Pro ověření výsledků z qRT-PCR byly hydrogenosomy parentního a rezistentního kmene trichomonád analyzovány pomocí Western blotu s monoklonální protilátkou proti dominantně exprimovaným hydrogenosomálním PFO (pravděpodobně PFOA, B1 a B2, pro přesné určení by však bylo potřeba udělat 2D elektroforézu). Na obrázku 30 je jasně viditelný specifický signál v hydrogenosomech parentních trichomonád. V hydrogenosomech rezistentních trichomonád tento signál není přítomný. Tato data odpovídají výsledkům získaným pomocí qRT-PCR i dřívejším studiím.



**Obr. 30: Lokalizace dominantně exprimovaných PFO v hydrogenosomech parentního a rezistentního kmene trichomonád pomocí Western blotu.** Typkou je znázorněn specifický signál v hydrogenosomech parentních trichomonád (P). V hydrogenosomech rezistentních trichomonád (R) tento signál není přítomen.

## 5.7 Alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy v *Trichomonas vaginalis*

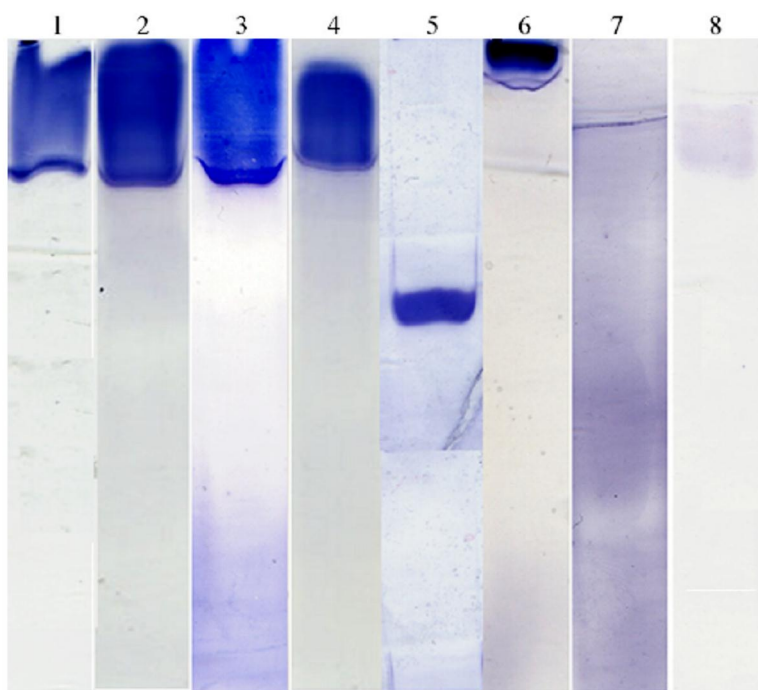
Na základ publikace (Brown *et al.*, 1999) bylo mým cílem charakterizovat alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs) v buňkách *T. vaginalis* a určit jejich vztah k enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáze D. Vzhledem k primární struktuře PFOD, značně odlišné od ostatních PFO paralogů jsem předpokládala, že by tento protein mohl metabolizovat některý ze substrátů identifikovaných ve zmíněné publikaci a tedy představovat některou z identifikovaných alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz. V pokusech bylo pracováno s celkovým lyzátem trichomonád a s hydrogenosomy purifikovanými pomocí izopyknické centrifugace na gradientu Percollu. Příprava membránových frakcí byla reprodukována dle publikace autorů Brown *et al.* (viz kap. 4.5.2) s jediným rozdílem, kdy byl použitý detergent pro primární solubilizaci membrán 0,5% oktylglukosid místo 0,5% dodecylglukosidu. Jednotlivé frakce byly separovány pomocí nedenaturující elektroforézy. Gel byl inkubován s anaerobním pufrům bez  $\beta$ -merkaptoetanolu s 10 mM indolpyruvát, 200  $\mu$ M CoA a 2 mg/ml nitro blue tetrazolium (NBT). Přítomnost aktivity byla prokázána redukcí NBT na modrý formazan v gelu (obr. 31).

Dráha 1 na obrázku 31 představuje celkový lyzát *T. vaginalis* s 1% Tritonem X-100 a dráha 2 stejné hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované dle publikovaného postupu. V obou případech je jasně viditelný signál, což odpovídá datům ze zmíněné publikace. Jako negativní kontrola (obr. 31 č. 3) byly použity stejné hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované bez koenzymu A (tato kontrola nebyla v publikaci použita). Z obrázku je zřejmé, že také došlo k barevné reakci v gelu.

Zjištění, že by data publikovaná autory Brown *et al.*, nemusela být výsledkem enzymatické aktivity KORs, vedla k následným pokusům. Na obrázku 31 dráha 4 je znázorněn gel s hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100, který byl po ukončení elektroforézy zahříván při 70 °C po dobu 30 minut a následně inkubován s indolpyruvát, CoA a NBT. Zahřívání gelu mělo za cíl denaturaci proteinů, přesto je na obrázku jasně patrný signál. Jako kontrola, že k denuraci enzymů skutečně došlo, byla změněna aktivita hydrogenosomálního jablečného enzymu. Spektrofotometrické měření ukázalo, že je tento enzym po 30 minutách inkubace v 70 °C neaktivní.

Jako další negativní kontroly nám posloužily lidské červené krvinky smíchané s 1% Tritonem X-100 a stejný vzorkový pufr pro nativní elektroforézu obsahující 1% Triton X-100 (obr. 31 - 5, 6). Oba vzorky byly inkubovány s indolpyruvát, NBT a bez CoA.

Výsledky jasn ukazují, že došlo k vytvoření modrého formazanu. Iste hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100 inkubované v anaerobním pufru s CoA, NBT a bez indolpyruvátu nevykazovaly žádnou barevnou reakci (obr. 31 ó 7). A stejn tomu bylo i u hydrogenosom bez Tritonu X-100 inkubovaných s indolpyruvátém, NBT a CoA (obr. 31 ó 8).



**Obr. 31: Nedenaturující elektroforéza membránových frakcí *T. vaginalis*. Vysv tlivky:**

1, celkový lyzát *T. vaginalis* s 1% Tritonem X-100; 2, iste hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100; 3, iste hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 inkubované bez CoA; 4, iste hydrogenosomy obsahující 1% Triton X-100 zah ívané po ukon ení separace protein 30 minut p i 70 °C; 5, lidské ervené krvinky s 1% Tritonem X-100 inkubované bez CoA; 6, vzorkový pufr obsahující pouze 1% Triton X-100; 7, iste hydrogenosomy s 1% Tritonem X-100 inkubované bez indolpyruvátu; 8, iste hydrogenosomy bez Tritonu X-100.

Tyto výsledky vedly k dal-ím ov ovacím pokus m. V aerobní kyvet byl smíchán ve 2 ml fosfátového pufru 5 mM indolpyruvát a 1 mg/ml NBT. Po p idání n kolika mikrolitr 10% Tritonu X-100 do-šlo b hem krátké chvíle k výraznému modro-fialovému zbarvení sm si. Nebyl-li ke sm si p idám Triton X-100, prob hla barevná reakce v ádech minut. Pokud byla místo pufru pouflita voda, k barevné reakci nedo-šlo.

Při anaerobním spektrofotometrickém měření enzymatické aktivity celkového lysátu rezistentních trichomonád obsahujícího 1% Triton X-100 s methyl viologinem jako akceptorem elektronů a indolpyruvátem také nebyla naměřena žádná aktivita. Při měření aktivity s celkovým lysátem parentních trichomonád byla pozorována indolpyruvát- a CoA-dependentní redukce methyl viologenu. Tato aktivita dosahovala přibližně 5% aktivity enzymu PFO měřené za stejných podmínek s pyruvátem. Pro kontrolu byla aktivita změřena také s purifikovanou hydrogenosomální PFO a indolpyruvátem. A skutečně, methyl viologen byl redukován, a to s podobnou účinností jako při použití celkového lysátu parentního kmene trichomonád Tv 10-02 a indolpyruvátu.

Předpokládaná aktivita alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz v buňkách trichomonád rezistentních k metronidazolu tedy nebyla prokázána. Redukce NBT na modro-fialový formazan je vyvolána neenzymatickou reakcí pomocí indolpyruvátu v přítomnosti Tritonu X-100. Skutečnost, že látky obsahující aromatický indolový kruh (tedy i indolpyruvát) dokáží redukovat tetrazoliové soli, potvrdila i dostupná literatura (Glennier *et al.*, 1960). *T. vaginalis* patrně nevlastní alternativní oxidoreduktázy. Všechny tyto výsledky byly shrnuty v publikaci Zedníková *et al.*, 2012, viz příloha.

## 6 Diskuze

Enzym pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza je jeden z klíčových enzymů hydrogenosomálního metabolismu pyruvátu u trichomonád. V genomu *Trichomonas vaginalis* bylo identifikováno celkem 7 paralogů pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO) – A, B1, B2, C, D, E, F (Carlton *et al.*, 2007). Nejvíce divergentní ze všech paralogů PFO je PFOD. Tato skutečnost mě vedla k podrobnějšímu zkoumání aktivity, míry exprese a funkce tohoto proteinu v buňkách trichomonád.

Pro charakterizaci enzymu jsem použila rekombinantní protein produkovaný v buňkách *E. coli*. Expresi PFOD v eukaryotním systému (v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*) nebyla úspěšná. Nabízí se několik možných vysvětlení, proč nebyla PFOD v kvasinkách exprimována. Jedním z možných důvodů mohla být neúspěšná homologní rekombinace, kdy se nemusel inzert *pfod* vložit na požadované místo v genomu. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahují sulfid reduktázu, enzym nezbytný pro biosyntézu metioninu, jehož jedna část je tvořena doménou homologní s amino-terminálním fragmentem PFO (Horner *et al.*, 1999). Tato skutečnost mohla mít teoreticky vliv na vkládání inzertu *pfod* do kvasinkového genomu a následnou expresi proteinu. Důvodem neúspěchu mohla také být degradace rekombinantního proteinu ihned po translaci, který mohl být pro kvasinky z neznámých důvodů kódní.

Expresi PFOD v *E. coli* jsem nejprve zkusila za aerobních podmínek. Průběh UV/Vis spektra rekombinantní PFOD indikoval přítomnost Fe-S center, protein však nebyl aktivní. Vzhledem k tomu, že je PFO velmi citlivá na přítomnost kyslíku, rozhodla jsem se pro expresi PFOD za anaerobních podmínek (v uzavřených nádobách s alternativním akceptorem elektronů –  $\text{NaNO}_3$ ). Anaerobní kultivace *E. coli* pro produkci citlivých proteinů je popsána například v publikaci autorů van den Berg *et al.*, 2000. Předpokládala jsem, že anaerobní podmínky by mohly pomoci ke správnému složení kvartérní struktury PFOD a Fe-S skupin.

Průběh UV/Vis spektra rekombinantní PFOD byl podobný spektru purifikované PFO v oblasti, ve které absorbují Fe-S skupiny (obr. 17). Dá se tedy usuzovat, že i rekombinantní PFOD obsahuje železo-sírné skupiny typické pro enzym PFO (Williams *et al.*, 1987), avšak pro objasnění přesného postupu a typu těchto center by bylo zapotřebí provést další studie.

Z bakteriální kultury byl rekombinantní protein PFOD izolován pomocí afinitní purifikace na koloně s náplní Ni-NTA agarózy za nativních podmínek. Molekulová hmotnost rekombinantní PFOD stanovená pomocí SDS-PAGE byla přibližně 130 kDa (obr. 16A). Tato hodnota souhlasí s teoretickou molekulovou hmotností vypočítanou z aminokyselinové sekvence (127 kDa).

Dodate ná analýza rekombinantního proteinu pomocí Western blotu s použitím protilátky proti polyhistidinovému zna ení potvrdila identitu purifikované PFOD (obr. 16B). Na Western blotu jednotlivých frakcí obsahujících rekombinantní PFOD byly vizualizované krom proteinu o p edpokládané velikosti i proteiny o nižší molekulové hmotnosti. Jejich identita nebyla blíže zkoumána. Patrn to jsou fragmenty PFOD, které vznikly rozpadem enzymu již v bakteriích i to m fle být d sledek aerobní izolace vedoucí taktéž k rozpadu enzymu. Pro lepší izola ní podmínky by bylo pot eba použít speciální anaerobní komory, nap . COY anaerobic chamber.

Na základ subjednotkové skladby holoproteinu je rozli-ováno n kolik typ PFO (viz kapitola 2.1.4). O PFO *T. vaginalis* bylo zji-eno, fle je to dimerní protein (Williams *et al.*, 1987), podobn jako jiné charakterizované homology. Na elu ním profilu protein z kapalinové chromatografie na molekulárním sítu byly patrné vrcholy odpovídající multimer m protein identifikovaných na SDS-PAGE (obr. 18). Vypo tená molekulová hmotnost protein ve frakci 15 byla cca 330 kDa. Pokud jsou dominantní proteiny opravdu fragmenty PFOD, které mají tendenci tvo it oligomery, pak to indikuje, fle je rekombinantní protein taktéž multimer a signál o velikosti 130 kDa na SDS elektroforéze je patrn rozpadlý holoenzym, kterého je z ejm velmi málo a je zna n nestabilní. Na obrázku 19B jsou na Western blotu vizualizované elu ní frakce z kapalinové chromatografie pomocí anti His protilátky. Rekombinantní PFOD byla p ítomna pouze ve frakci 19 a abundantní proteiny protilátka nedetekovala, p esto fle jsou jasn patrné na SDS elektroforéze i na Western blotu s anti PFOD protilátkou (obr. 19A, C). Toto je patrn zp sobeno rozpadem PFOD a ztrátou His tagu b hem izolace.

Rekombinantní PFOD jsem dále použila pro m ení enzymatické aktivity. šAlternativně substráty oxalacetát, indolpyruvát, fenylpyruvát, -ketobutyrát, -ketoglutarát a -ketomalonát byly podle mé pracovní hypotézy kandidáty na substrát, který by PFOD mohla p ednostn metabolizovat. Av-ak rekombinantní PFOD neredukovala methyl viologen s fládným z vybraných alternativních elektronových donor , ani se substrátem charakteristickým pro PFO, pyruvátem. Jedno z mofných vysv tlení tohoto výsledku je, fle do-lo k po-kození proteinu b hem izolace atmosférickým kyslíkem. PFOD bude patrn stejn jako enzym PFO velmi citlivá na p ítomnost kyslíku, který po-kozuje Fe-S skupiny enzymu vedoucí k jeho rozpadu a ztrát funkce (Lindmark and Müller, 1973; Outten, 2007). Pop ípad heterologní bakteriální systém v bec nemusí být schopen vyprodukovat aktivní enzym a správn poskládat Fe-S centra, p esto fle je v literatu e popsána úsp -ná exprese aktivní rekombinantní PFO (Pieulle *et al.*, 1987). Jiné vysv tlení, které se nabízí, je, fle jsem nenalezla vhodný substrát, který by PFOD dokázala metabolizovat. Tímto substrátem by teoreticky mohla být nap . -keto kyselina s vy-ím po tem uhlík nefl ty i.



Pro charakterizaci PFOD v nativních podmínkách jsem provedla také transformaci trichomonád vektorem TagVag obsahujícím PFOD a 6x His tag, av-ak trichomonády transformované tímto plasmidem PFOD neexprimovaly. Jedna z možných interpretací je stavba konstruktů, který obsahoval 6x His tag i 2x HA tag. Takto navržený konstrukt nemusel být vzhledem ke dvěma značením správně složený i mohl být pro trichomonády škodlivý. Zkušenosti s neúspěšnou expresí proteinu u transformovaných trichomonád vektorem TagVag obsahujícím 6x His tag mi potvrdili i někteří kolegové z laboratoře (Mgr. Tamara Smutná, katedra Parazitologie, Karlova univerzita v Praze, osobní sdělení). Konstrukty s polyhistidinovým značením jsou pravděpodobně škodlivé a vedou k omezení exprese proteinů.

Cílem transformace trichomonád kmene T1 vektorem TagVag obsahujícím PFOD bez signální sekvence pro import do hydrogenosom a 2x HA tag bylo ověření lokalizace PFOD v trichomonádách. Overexprimovaný protein byl lokalizován pomocí SDS elektroforézy a Western blotu do hydrogenosom, což bylo ověřeno na purifikovaných organelech získaných diferenciální centrifugací buněčného homogenátu (obr. 24 a 25). Imunofluorescenční značení potvrdilo hydrogenosomální lokalizaci proteinu (obr. 26). Tento výsledek není úplným překvapením, protože enzym PFO je ve šwild type organismech lokalizovaný v této organelle, av-ak konstrukt pro transformaci trichomonád neobsahoval hydrogenosomální signální sekvenci, a přesto došlo k translokaci rekombinantního proteinu do hydrogenosom. Signální sekvence PFO, respektive PFOD, je oproti jiným hydrogenosomálním proteinům extrémně krátká (Hrdý and Müller, 1995a), obsahuje pouze několik aminokyselin. O nezbytnosti takto krátké sekvence se diskutuje a není vyloučena ani nezbytnost zatím neidentifikovaného vnitřního importního signálu (Mentel *et al.*, 2008; Burstein *et al.*, 2012). Pro charakterizaci tohoto signálu je zapotřebí provést mnoho dalších studií, av-ak fakt, že rekombinantní PFOD bez signální sekvence byla s vysokou specificitou lokalizovaná do hydrogenosom, ukazuje, že vnitřní signál existuje.

V publikaci z podzimu roku 2011 autor Schneider *et al.* byla zveřejněna analýza hydrogenosomálního proteomu *T. vaginalis*, ve které bylo v organelle identifikováno 6 z celkem 7 genomem kódovaných PFO. Dominantně exprimované jsou dle publikace PFOA a B1. Hydrogenosomální PFOB2, C, E a F jsou také exprimované, ale podstatně méně než PFOA a B1. Protein, který mě nejvíce zajímal, tedy PFOD, nebyl dle publikace autor Schneider *et al.* v hydrogenosomech trichomonád citlivých na metronidazol nalezen. Av-ak při analýze zatím nepublikovaných proteomických dat z hydrogenosom trichomonád kmene T1 byly nalezeny kromě dominantně exprimovaných PFOA, B1 a B2 také PFOE a D (Mgr. Petr Jedelský, katedra Parazitologie, Karlova univerzita v Praze, osobní sdělení). Tyto rozdíly jsou pravděpodobně

způsobeny malým množstvím přítomných proteinů v analyzovaných vzorcích a pravděpodobně tak nedošlo k jejich detekci hmotnostním spektrometrem.

Pomocí metody kvantitativní Real Time PCR jsem chtěla získat představu o relativní expresi všech 7 genů kódujících paralogy pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy. Relativní exprese byla jednoduše nejvyšší u PFOA, B1 a B2, což potvrzuje výše uvedené výsledky autorů Schneider *et al.* a Mgr. Petra Jedelského. Relativní exprese mRNA PFOE a F byla velmi nízká, ale domnívám se, že i přesto jsou přepisovány do proteinu. U trichomonád rezistentních k metronidazolu dochází k poklesu míry exprese některých hydrogenosomálních enzymů podílejících se na aktivaci tohoto léku v trichomonádách pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (Kulda, 1999). Tyto výsledky potvrdila i kvantitativní Real Time PCR, kdy došlo ke snížení relativních expresí dominantně exprimovaných PFOA, B1 a B2 na nulové hodnoty. Zajímavý výsledek však přinesla qRT PCR o relativní expresi PFOC u rezistentních trichomonád. Relativní exprese tohoto genu se oproti ostatním PFO mírně zvýšila. Není tedy vyloučeno, že u těchto trichomonád může být PFOC, respektive PFOE exprimována.

V grafu relativních expresí PFO (obr. 29) je patrné, že výsledné směrodatné odchylky jednotlivých měření byly značně vysoké. Tento výsledek patrně poukazuje na schopnost trichomonád přizpůsobit se daným podmínkám (např. fluktuacím v kultivačních podmínkách, stáří média, teplotě, dobou inkubace, atd.) pomocí regulace genové exprese. Pro získání přesných dat z kvantitativní Real Time PCR je potřeba zvážit mnoho faktorů, které mohou výsledky velmi zkreslit. Byly provedeny všechny důležité kontroly, avšak pro budoucí pokusy bude potřeba provést detailní analýzu efektivnosti primerů a zahrnout do měření více vnitřních kontrol (referenčních genů).

Abych zjistila lokalizaci a případnou expresi nativní PFOC v *T. vaginalis*, byla vytvořena polyklonální protilátka namířená proti nekonzervativní části proteinu PFOC. Na Western blotu hydrogenosomální frakce trichomonád senzitivních k metronidazolu je patrný signál o velikosti přibližně 130 kDa, což odpovídá teoretické molekulové hmotnosti PFOC, avšak protilátka rozeznává velmi silně i proteiny o menší molekulové hmotnosti (např. jablečný enzym o 65 kDa). Na Western blotu hydrogenosomální frakce rezistentních trichomonád s anti-PFOC protilátkou byl viditelný podobný proteinový profil kromě požadovaného signálu o velikosti cca 130 kDa (obr. 23). Z tohoto výsledku se dá usuzovat, že anti-PFOC protilátka je nespecifická a nemohou s jistotou říci, je-li PFOC v hydrogenosomech přítomna.

Mým dalším cílem proto bylo zjistit případný vliv proteinu PFOC na rezistenci trichomonád k metronidazolu. Buď trichomonád kmene Tv 10-02 MR 100 jsem transformovala vektorem TagVag s PFOC bez signální sekvence. Jako kontrola byla provedena transformace

trichomonád vektorem TagVag s hydrogenosomální procesující peptidázou (HPP) (Tchíd *et al.*, 2008). Transformované trichomonády p effily kultivaci pr m rn 8 dní (v etn kontroly). Po této době došlo k úmrtí bun k. Pokud byl do média přidán metronidazol (10 µg/ml), došlo k úmrtí bun k do 24 hodin. Bohužel se bu ky nepoda ilo p evést do média bez agaru a poufít je pro další studie. Trichomonády rezistentní k metronidazolu jsou velmi citlivé k náhlým zm nám (nap . stá í média, doba o kování, množství inokula, oxidativní stres atd.), tudífl transformace, kterou bu ky p effily 8 dní se dá považovat za úspě ch. Předpokládám, že transformace rezistentních trichomonád m la za následek naru-ení jejich bun nému metabolismu vedoucí ke smrti trichomonád.

V roce 1999 vy-el lánek (Brown *et al.*, 1999), ve kterém byly popsány dva nové enzymy karbohydrátového metabolismu *T. vaginalis*, tzv. alternativní 2-keto acid oxidoreduktázy (KORs). V pokusech bylo ukázáno, že jsou tyto KORs pravd podobn pln aktivní v trichomonádách rezistentních k metronidazolu, že se vyskytují p eváfln v membránových frakcích a jako substrát preferují indolpyruvát. Auto i usuzovali, že tyto enzymy jsou klí ové pro p effití rezistentních trichomonád, které mají defektní energetický metabolismus pyruvátu v hydrogenosomech, a KORs jim umo fl ují syntetizovat ATP na ú et jiných substrát . Tato publikace m vedla k tomu, že jsem se pokusila ur it vztah KORs k PFOD. Vzhledem k primární struktu e PFOD zna n odli-né od ostatních PFO paralog jsem předpokládala, že by tento protein mohl p edstavovat n kterou z identifikovaných alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz. Prvním krokem k ov ení identity KORs byla jejich purifikace, pokusila jsem se tedy reprodukovat popsáný postup a p ipravit membránové frakce obohacené o aktivitu KORs. B hem pokus se v-ak ukázalo, že výsledky publikované autory Brown *et al.* jsou patrn artefakt zp sobený neenzymatickou redukcí NBT na modro-fialový formazan pomocí indolpyruvátu a Tritonu X-100 (obr. 31). Z tohoto d vodu byly provedeny ov ovací pokusy (nativní elektroforéza s kontrolními vzorky a spektrofotometrická m ení), které potvrdily, že data publikovaná autory Brown *et al.* nejsou výsledkem enzymatické aktivity KORs. Předpokládaná aktivita alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz v bu kách trichomonád rezistentních k metronidazolu nebyla prokázána.

Nabízí se proto otázka, existuje-li v bec v hydrogenosomech rezistentních trichomonád n jaký alternativní zdroj ATP vzhledem k tomu, že tyto trichomonády nemají hlavní paralogy PFO i zda je ATP do hydrogenosom importováno a jakým zp sobem. V hydrogenosomální membrán trichomonád je p ítomný ATD/ADP transportér Hmp31 (Dyall and Johnson, 2000), který by teoreticky mohl transportovat ATP do organely, jako je tomu u hydrogenosomálního homologu Hmp31 u *Trichomonas gallinae* (Tjaden *et al.*, 2004). V hydrogenosomech parentních

trichomonád byl identifikován enzym ATP:AMP fosfotransferáza (adenylát kináza) (Declerck and Müller, 1987), která balancuje poměr ATP, AMP a ADP a indikuje přítomnost fungujícího energetického metabolismu. Tento enzym byl identifikován i v hydrogenosomálním proteomu rezistentních trichomonád a patrně se jeho exprese v souvislosti s rezistencí nemění (nepublikované výsledky Beltrán, Jedelský, Tachezy, katedra Parazitologie, Karlova univerzita). V hydrogenosomech rezistentních trichomonád je navíc přítomna i sukcinát thiokináza (Rasoloson *et al.*, 2002), která je zodpovědná za syntézu ATP v hydrogenosomech. Hydrogenosomy rezistentních trichomonád si také zachovaly funkční Fe-S cluster assembly systém (nepublikované výsledky Tachezy, Tůma, Jedelský, katedra Parazitologie, Karlova univerzita), pro který je potřeba ATP. Odpovědi na otázky, jakým způsobem získávají hydrogenosomy rezistentních trichomonád ATP a jaké mechanismy zůstaly v souvislosti s rezistencí zachovány, snad přinesou budoucnost.

## 7 Záv r

Ve své diplomové práci jsem zam ěřila na hydrogenosomální protein pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu D parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*.

Rekombinantní PFOD jsem izolovala z bakteriálního lyzátu pomocí afinitní purifikace na niklové kolon . Expresi proteinu v eukaryotním systému (kvasinkách) nebyla úspěšná. Rekombinantní PFOD byla použita pro měření enzymatické aktivity a analýzu absorpčního UV/Vis spektra. Aktivita PFOD při anaerobním spektrofotometrickém měření nebyla naměřena s žádným testovaným substrátem. Průběh spektra proteinu PFOD byl podobný spektru PFO v oblasti, ve které absorbují Fe-S skupiny, a PFOD patrně obsahuje Fe-S centra jako je tomu u enzymu PFO. Na elučním profilu proteinů z kapalinové chromatografie na molekulárním sítu byly patrné vrcholy odpovídající multimerům. Protein PFOD se patrně vyskytuje v *E. coli* jako multimer.

Protein PFOD jsem lokalizovala v buňkách transformovaných trichomonád. Metodou přípravy subcelulárních frakcí a nepřímé imunofluorescence jsem zjistila, že PFOD je translokována do organely hydrogenosomu, přestože konstrukt pro transformaci trichomonád neobsahoval signální sekvenci. Transformace trichomonád vektorem TagVag s PFOD a 6x His tagem nebyla úspěšná.

Pomocí metody kvantitativní Real Time PCR jsem analyzovala relativní expresi PFO genů (A-F). Dominantně exprimované geny jsou *pfoa*, *b1* a *pfoB2*. Relativní exprese PFO genů byla u rezistentních trichomonád snížena kromě *pfoC* a *pfoD*, u nichž byla oproti ostatním PFO mírně zvýšena.

Dříve publikovaná aktivita alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz v buňkách trichomonád rezistentních k metronidazolu nebyla prokázána. Redukce NBT na modro-fialovou usazeninu formazan je vyvolána neenzymatickou redukcí NBT pomocí indolpyruvátu a Tritonu X-100.

## 8 Seznam poufité literatury

Akhmanova, A., Voncken, F., Van, A. T., Van, H. A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., Hackstein, J. H. 1998. A hydrogenosome with a genome. *Nature*. **396**, 527-528.

Akhmanova, A., Voncken, F. G., Hosea, K. M., Harhangi, H., Keltjens, J. T., op den Camp, H. J., Vogels, G. D., Hackstein, J. H. 1999. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol Microbiol*. **32**, 1103-1114.

Aldana, L. P., Kato, M., Kondo, T., Nakagawa, S., Zheng, R., Sugiyama, T., Asaka, M., Kwon, D. H. 2005. In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in *rdxA* and *frxA* genes from *Helicobacter pylori* isolates. *J Infect Chemother*. **11**, :59-63.

Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. Wagner, A. F. V. 1999. Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nature Struc. Biol*. **6**, 969-975.

Benchimol, M., De Souza, W. 1983. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J Protozool* **30**, 422-425.

Benchimol, M. 1999. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol Cell*. **91**, 165-174.

Benchimol, M. 2004. Trichomonads under Microscopy. *Microsc Microanal*. **10**, 528-50.

van den Berg, W. A., Hagen, W. R., van Dongen, W. M. 2000. The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *Eur J Biochem*. **267**, 666-76.

Berndt, C., Lillig, C. H., Holmgren, A. 2008. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta*. **1783**, 641-50.

Blamey, J. M, Adams, M. W. 1993. Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim Biophys Acta*. **1161**, 19-27.

Boschi-Müller, S., Olry, A., Antoine, M., Branlant, G. 2005. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*. **1703**, 231-8.

Boxma, B., Voncken, F., Jannink, S., van Alen, T., Akhmanova, A., van Weelden, S. W., van Hellemond, J. J., Ricard, G., Huynen, M., Tielens, A. G., Hackstein, J. H. 2004. The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Mol Microbiol*. **51**, 1389-99.

- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A., Hackstein, J. H. 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*. **434**, 74-9.
- Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E., Johnson, P. J. 1997. Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J*. **16**, 3484-93.
- Brostedt, E., Nordlund, S. 1991. Purification and partial characterization of a pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Biochem J*. **279**, 155-8.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., Dodd, H. N., Chen, N., Upcroft, P. 1999. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*. **98**, 203-214.
- Bui, E. T., Bradley, P. J., Johnson, P. J. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 9651-9656.
- Burstein, D., Gould, S. B., Zimorski, V., Kloesges, T., Kiosse, F., Major, P., Martin, W. F., Pupko, T., Dagan, T. 2012. A machine learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*. **11**, 217-28.
- 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., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de, P. Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Va á ová, <sup>TM</sup>, Villalvazo, M., Haas, B. J., Perteza, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdý, I., Horvátová, L., Zubá ová, Z., Doleflal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., 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. 1986. The kingdoms of organisms. *Nature*. **324**, 416-417.
- Cavalier-Smith, T. 1987. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann N Y Acad Sci*. **503**, 55-71.
- Chapman, A., Linstead, D. J., Lloyd, D., Williams, J. 1985. <sup>13</sup>C-NMR reveals glycerol as an unexpected major metabolite of the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett*. **191**, 287-92.
- Clarke, E. D., Wardman, P., Goulding, K. H. 1980. Anaerobic reduction of nitroimidazoles by reduced flavin mononucleotide and by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*. **29**, 2684-2687.
- Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C., Müller, S. 2004. The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J Biol Chem*. **279**, 5249-5256.

Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-mcclelland, S. F., Petrin, D. P., Garber, G. E. 2004. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Society*. **17**, 783-793.

erkasovová, A., Novák, J., erkasov, J., Kulda, J., Tachezy, J. 1988. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ Carolinae Biol*. **30**, 505-512.

trnactá, V., Ault, J. G., Stejskal, F., Keithly, J. S. 2006. Localization of pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol*. **53**, 225-31.

Danovaro, R., Dell'Anno, A., Pusceddu, A., Gambi, C., Heiner, I., Kristensen, R. M. 2010. The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC Biol*. **8**, 30.

Declerck, P. J., Müller, M. 1987. Hydrogenosomal ATP:AMP phosphotransferase of *Trichomonas vaginalis*. *Comp Biochem Physiol*. **88**, 575-580.

Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., Segurens, B., Anthouard, V., Texier, C., Blot, N., Poirier, P., Ng, G. C., Tan, K. S., Artiguenave, F., Jaillon, O., Aury, J. M., Delbac, F., Wincker, P., Vivarès, C. P., El Alaoui, H. 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol*. **12**, R29.

Diamond, L. S. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol*. **43**, 488-490.

Ding, H., Harrison, K., Lu, J. 2005. Thioredoxin reductase system mediates iron binding in IscA and iron delivery for the iron-sulfur cluster assembly in IscU. *J Biol Chem*. **280**, 30432-7.

Docampo, R., Moreno, S. N., Mason, R. P. 1987. Free radical intermediates in the reaction of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in *Tritrichomonas foetus* hydrogenosomes. *J Biol Chem*. **262**, 12417-20.

Doleflal, P., Va á ová, <sup>TM</sup>, Tachezy, J., Hrdý, I. 2004. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene*. **329**, 81-92.

Drmota, T., Proost, P., Van, R. M., Weyda, F., Kulda, J., Tachezy, J. 1996. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol Biochem Parasitol*. **83**, 221-234.

Dyall, S. D., Johnson, P. J. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr Opin Microbiol*. **3**, 404-11.

Edwards, D. I. 1993a. Nitroimidazole Drugs - Action and Resistance Mechanisms I. Mechanisms of Action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **31**, 9-20.

Edwards, D. I. 1993b. Nitroimidazole Drugs - Action and Resistance Mechanisms II. Mechanisms of Action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **31**, 201-10.



- Ellis, J. E., McIntyre, P. S., Saleh, M., Williams, A. G., Lloyd, D. 1991. Influence of CO<sub>2</sub> and low concentrations of O<sub>2</sub> on fermentative metabolism of the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *J Gen Microbiol.* **137**, 1409-1417.
- Ellis, J. E., Cole, D., Lloyd, D. 1992. Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **56**, 79-88.
- Ellis, J. E., Yarlett, N., Cole, D., Humphreys, M. J., Lloyd, D. 1994. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology.* **140**, 2489-2494.
- Finlay, B. J., Fenchel, T. 1989. Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiol Lett.* **65**, 311-314.
- Furdui, C., Ragsdale, S. W. 2002. The roles of coenzyme A in the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase reaction mechanism: rate enhancement of electron transfer from a radical intermediate to an iron-sulfur cluster. *Biochemistry.* **41**, 9921-37.
- Gauld, J. W., Eriksson, L. A. 2000. Oxidative degradation of pyruvate formate-lyase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2035-2040.
- Gelius-Dietrich, G., Henze, K. 2004. Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J Eukaryot Microbiol.* **51**, 456-63.
- Gijzen, H. J., Broers, C. A. M., Barughare, M., Stumm, C. K. 1991. Methanogenic Bacteria As Endosymbionts of the Ciliate *Nyctotherus Ovalis* in the Cockroach Hindgut. *Applied and Environmental Microbiology.* **57**, 1630-1634.
- Glenner, G. G., Weissbach, H., Redfield, B. G. 1960. The histochemical demonstration of enzymatic activity by a nonenzymatic redox reaction ó reduction of tetrazolium salts by indolyl-3-acetaldehyde. *J Histochem Cytochem.* **8**, 258-61.
- Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen van Zanten, S. J., Berg, D. E., Hoffman, P. S. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol.* **28**, 383-93.
- Goosen, N. K., Vanderdrift, C., Stumm, C. K., Vogels, G. D. 1990. End Products of Metabolism in the Anaerobic Ciliate *Trimyema Compressum*. *Fems Microbiology Letters.* **69**, 171-175.
- Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R., Voncken, F. G. 1999. Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* **7**, 441-447.
- Hackstein, J. H., Tjaden, J., Huynen, M. 2006. Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: products of evolutionary tinkering! *Curr Genet.* **50**, 225-45.

- Horner, D. S., Hirt, R. P., Embley, T. M. 1999. A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol.* **16**, 1280-1291.
- Hrdý, I., Müller, M. 1995. Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *J Eukaryot Microbiol.* **42**, 593-603.
- Hrdý, I., Müller, M. 1995a. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol.* **41**, 388-96.
- Hrdý, I., Hirt, R. P., Dolefal, P., Bardo ová, 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., Cammack, R., Stopka, P., Kulda, J., Tachezy, J. 2005. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 5033-5036.
- Hughes, N. J., P. A. Chalk, C. L. Clayton, J. K. David. 1995. Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate:flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **177**, 3953-3959.
- Inui, H., Ono, K., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S. 1987. Purification and characterisation of pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem.* **262**, 9130-9135.
- Jenkins, T. M., Gorrell, T. E., Müller, M., Weitzman, P. D. 1991. Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**, 892-896.
- Kerscher, L., Oesterhelt, D. 1981. The catalytic mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. One-electron transfer at two distinct steps of the catalytic cycle. *Eur J Biochem.* **116**, 595-600.
- Kletzin, A., Adams, M. W. 1996. Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol.* **178**, 248-57.
- Kulda, J., Vojt chovská, M., Tachezy, J., Demes, P., Kunzová, E. 1982. Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis-A case report. *Br J Vener Dis.* **58**, 394-9.
- Kulda, J., Tachezy, J., erkasovová, A. 1993. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol.* **40**, 262-9.
- Kulda, J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J Parasitol.* **29**, 199-212.

- Kulda, J. Hrdý, J., 2007. Hydrogenosome: The Site of 5-Nitroimidazole Activation and Resistance. *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*. Microbiology Monographs, Springer - Verlag Berlin Heidelberg.
- Land, K. M., Clemens, D. L., Johnson, P. J. 2001. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. *Experimental parasitology*. **97**, 102-10.
- Lantsman, Y., Tan, K. S., Morada, M., Yarlett, N. 2008. Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology*. **154**, 2757-66.
- LaRusso, N. F., Tomasz, M., Müller, M., Lipman, R. 1977. Interaction of Metronidazole with Nucleic-Acids In vitro. *Molecular Pharmacology*. **13**, 872-882.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I. B. H., Altmann, F., Duchene, M. 2007. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. *Plos Biology*. **5**, 1820-1834.
- 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.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Duchêne, M. 2010. The flavin inhibitor diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways. *Mol Biochem Parasitol*. **171**, 17-24.
- Lin, W. C., Yang, Y. L., Whitman, W. B. 2003. The anabolic pyruvate oxidoreductase from *Methanococcus maripaludis*. *Arch Microbiol*. **179**, 444-56.
- Lindmark, D. G., Müller, M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*. **248**, 7724-7728.
- Lindmark, D. G., Müller, M. 1975. Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol*. **61**, 552-554.
- Lindmark, D. G. and Müller, M. 1976. Anti-Trichomonad Action, Mutagenicity, and Reduction of Metronidazole and Other Nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **10**, 476-482.
- Lloyd, D., Kristensen, B. 1985. Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *J Gen Microbiol*. **131**, 849-53.
- Meingassner, J. G., Mieth, H., Czok, R., Lindmark, D. G., Müller, M. 1978. Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in *Tritrichomonas foetus*. *Antimicrob Agents Chemother*. **13**, 1-3.

- Mentel, M., Zimorski, V., Haferkamp, P., Martin, W., Henze, K. 2008. Protein import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* involves both N-terminal and internal targeting signals: a case study of thioredoxin reductases. *Eukaryot Cell*. **7**, 1750-1757.
- Mentel, M., Martin, W. 2010. Anaerobic animals from an ancient, anoxic ecological niche. *BMC Biol.* **8**, 32.
- Mertens, E., van Schaftingen, E., Müller, M. 1992. Pyruvate kinase from *Trichomonas vaginalis*, an allosteric enzyme stimulated by ribose 5-phosphate and glycerate 3-phosphate. *Mol Biochem Parasitol.* **54**, 13-20.
- Morada, M., Smid, O., Hampl, V., Sutak, R., Lam, B., Rappelli, P., Dessì, D., Fiori, P. L., Tachezy, J., Yarlett, N. 2011. Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **176**, 51-4.
- Müller, M., Lindmark, D. G. 1976. Uptake of metronidazole and its effect on viability in trichomonads and *Entamoeba invadens* under anaerobic and aerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* **9**, 696-700.
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *J Gen Microbiol.* **139**, 2879-2889.
- Mukherjee, M., Brown, M. T., McArthur, A. G., Johnson, P. J. 2006a. Proteins of glycine decarboxylase complex in hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* **5**, 2062-2071.
- Mukherjee, M., Sievers, S. A., Brown, M. T., Johnson, P. J. 2006b. Identification and biochemical characterisation of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* **5**, 2072-2078.
- Nakazawa, M., Inui, H., Yamaji, R., Yamamoto, T., Takenaka, S., Ueda, M., Nakano, Y., Miyatake, K. 200. The origin of pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* **479**, 155-156.
- Nordlund, P., Reichard, P. 2006. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* **75**, 681-706.
- Odom, J. R. 1984. The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press. Cambridge. England.
- O'Fallon, J. V., Wright, R. W. Jr, Calza, R. E. 1991. Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem J.* **274**, 595-9.
- Outten, F. W. 2007. Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches. *Nat Chem Biol.* **3**, 206-7.
- Payne, M. J., Chapman, A., Cammack, R. 1993. Evidence for an [Fe]-type hydrogenase in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett.* **317**, 101-4.

- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K., Samuelson, J. 2009. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **53**, 458-64.
- Page-Sharp, M., Behm, C. A., Smith, G. D., 1996. *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology*. **142**, 207-211.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. **11**, 300-17.
- Pieulle, L., Guigliarelli, B., Asso, M., Dole, F., Bernadac, A., Hatchikian, E. C. 1995. Isolation and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio africanus*. *Biochim Biophys Acta*. **1250**, 49-59.
- Pieulle, L., Magro, V., Hatchikian, E. C. 1997. Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability. *J Bacteriol*. **179**, 5684-5692.
- Putz, 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*. *Mol Biochem Parasitol*. **142**, 212-223.
- Rasoloson, D., Tomková, E., Cammack, R., Kulda, J., Tachezy, J. 2001. Metronidazole resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased sensitivity to oxygen. *Parasitology*. **123**, 456-56.
- Rasoloson, D., Va á ová, S., Tomková, E., Rázga, J., Hrdý, I., Tachezy, J., Kulda, J. 2002. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*. **148**, 2467-77.
- Rotte, C., Stejskal, F., Zhu, G., Keithly, J. S., Martin, W. 2001. Pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol Biochem Evol*. **18**, 710-720.
- Schirch, V., Szebenyi, D. M. 2005. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr Opin. Chem Biol*. **9**, 482-487.
- Schnarrenberger, C., Martin, W. 2002. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur J Biochem*. **269**, 868-883.
- Slamovits, C. H., Keeling, P. J. 2006. Pyruvate-phosphate dikinase of oxymonads and parabasalids and the evolution of pyrophosphate-dependent glycolysis in anaerobic eukaryotes. *Eukaryot Cell*. **5**, 148-54.
- Schiestl, R. H., Gietz, R. D. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*. **16**, 339-346.

Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyall, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A., Johnson, P. J. 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int J Parasitol.* **41**, 1421-34.

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. *Eukaryot Cell.* **8**, 47-55.

Steinbüchel, A., Müller, M. 1986. Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **20**, 57-65.

Stenbüchel, A., Tachezy, J. (editor). 2008. Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes.

Thid, O., Matu-ková, A., Harris, S. R., Ku era, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutejová, E., Hirt, R. P., Embley, T. M., Janata, J., Tachezy, J. 2008. Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *trichomonas vaginalis* and *giardia intestinalis*. *PLoS Pathog.* **4**, e1000243.

Tachezy, J., Sánchez, L. B., Müller, M. 2001. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol.* **18**, 1919-28.

Tjaden, J., Haferkamp, I., Boxma, B., Tielens, A. G., Huynen, M., Hackstein, J. H. 2004. A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Mol Microbiol.* **51**, 1439-46.

Vita, N., Hatchikian, E.C., Nouailler, M., Dolla, A., Pieulle, L. 2008. Disulfide bond-dependent mechanism of protection against oxidative stress in pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of anaerobic *Desulfovibrio bacteria*. *Biochemistry.* **47**, 957-64.

West, S. B., Wislocki, P. G., Fiorentini, K. M., Alvaro, R., Wolf, F.J., Lu, A.Y. 1982. Drug residue formation from ronidazole and 5-nitroimidazole. I. Characterization of in vitro protein alkylation. *Chem Biol Interact.* **41**, 265-79.

Whatley, J. M., John, P., Whatley, F. R. 1979. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **204**, 165-87.

Wieland, O. H. 1983. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **96**, 123-70.

Williams, K., Lowe, P. N., Leadlay, P. F. 1987. Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J.* **246**, 529-36.

World Health Organization. Geneva. 2001. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. [www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm](http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm).

- Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D., Williams, A. 1981. Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. *Biochem J.* **200**, 365-72.
- Yarlett, N., Lloyd, D., Williams, A. G. 1985. Butyrate formation from glucose by the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. *Biochem J.* **228**, 187-92.
- Yarlett, N., Yarlet, N. C., Lloyd, D. 1986. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Mol Biochem Parasitol.* **19**, 111-6.
- Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C., Greenwood, C. A. 1986a. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J.* **236**, 729-39.
- Yarlett, N., Lindmark, D. G., Goldberg, B., Moharrami, M. A., Bacchi, C. J. 1994. Subcellular localization of the enzymes of the arginine dihydrolase pathway in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Eukaryot Microbiol.* **41**, 554-9.
- Yoon, K.S., Ishii, M., Kodama, T., Igarashi, Y. 1997. Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol.* **167**, 275-9.
- Zedníková, V., Beltrán, N. C., Tachezy, J., Hrdý, I. 2012. Alternative 2-keto acid oxidoreductases in *Trichomonas vaginalis*: artifact of histochemical staining. *Mol Biochem Parasitol.* **181**, 57-9.

## **9 P íloha**