

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



**Bc. Bruno Sandner**

**Metabolismus mědi u *Trypanosoma brucei***

Copper metabolism in *Trypanosoma brucei*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha, 2024

## Prohlášení

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

V Praze 29. 4. 2024

Podpis .....

## **Poděkování:**

Rád bych na tomto místě poděkoval zejména svému školiteli RNDr. Janu Machovi Ph.D. za odborné rady, trpělivost a pomoc při zpracování této práce. Dále bych rád poděkoval ostatním členům našeho výzkumného týmu za jejich ochotu sdílet své zkušenosti a rady při mých experimentech a RNDr. Zdeňku Vernerovi, který se mnou konzultoval statistiku. V neposlední řadě si velmi vážím podpory a pomoci svých kamarádů, kteří mi dávali cennou zpětnou vazbu a dokázali mi zlepšit den v těžkých chvílích. Na závěr bych rád vyjádřil velký vděk své rodině za jejich obrovskou podporu po celou dobu studia.

## Abstrakt

Měď slouží jako kofaktor mnoha důležitých enzymů kvůli svým redoxním vlastnostem. Avšak přítomnost volných iontů mědi v buňce může vést k nežádoucím účinkům, jako je agregace proteinů a ztráta železo-sirných klastrů, což v konečném důsledku může způsobit buněčnou smrt. Z tohoto důvodu je intracelulární koncentrace mědi v organismu přísně kontrolována. Metabolismus mědi u parazitických organismů není příliš probádaný, proto se v této práci věnuji organismu *Trypanosoma brucei*, původci spavé nemoci a onemocnění u dobytka zvané nagana. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem je měď transportována v buňce, a otestovat její toxicitu u *T. brucei*. Porozumění transportu mědi v buňce by mohlo umožnit vývoj léčiv, která narušují homeostázu mědi a využívají její toxické vlastnosti.

V této diplomové práci byla popsána funkce ATPázy P1B typu *T. brucei* v přenosu mědi na základě funkční komplementace. Úspěšně se podařilo snížit exprese ATPázy P1B typu pomocí RNA interference u *T. brucei*. Snížená exprese tohoto transportéru vedla ke zvýšené citlivosti na měď, což ukazuje na její potenciální roli při detoxifikaci mědi. Dále jsme poukázali na vyšší odolnost vůči mědi a její vyšší potřebu v metabolismu hmyzí formy *T. brucei* ve srovnání s krevní formou pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou a kvantifikace toxicity mědi. Též byla sledována exprese ATPázy P1B typu *T. brucei* při zvýšené a snížené koncentraci mědi pomocí hmotnostní spektrometrie.

## Abstract

Copper serves as a cofactor for many important enzymes due to its redox properties. However, the presence of free copper ions in the cell can lead to undesired effects such as protein aggregation and loss of iron-sulfur clusters, ultimately resulting in cell death. Therefore, the intracellular concentration of copper in parasitic organisms is strictly controlled. Copper metabolism in parasitic organisms is not well understood, hence this work focuses on *Trypanosoma brucei*, the causative agent of sleeping sickness and the disease in cattle called nagana. The aim of this thesis was to investigate how copper is transported in the cell and to test its toxicity in *T. brucei*. Understanding copper transport in the cell could lead to the development of drugs disrupting copper homeostasis and exploit of its toxic properties.

In this diploma thesis, the function of the P1B-type ATPase of *T. brucei* in copper transport was described based on functional complementation. Successfully, the expression of the P1B-type ATPase was reduced using RNA interference in *T. brucei*. The decreased expression of this transporter led to increased sensitivity to copper, indicating its role in copper detoxification. Furthermore, we demonstrated the higher resistance to copper and its increased requirement in the metabolism of the insect form of *T. brucei* compared to the bloodstream form using inductively coupled plasma mass spectrometry and quantification of copper toxicity. The expression of *T. brucei* P1B-type ATPase was also monitored at increased and decreased copper concentrations using mass spectrometry.

# Obsah

1 Úvod.....	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 Měď.....	2
2.1.1 Transport mědi .....	3
2.1.2 Toxicita mědi.....	7
2.1.3 Měď a její podíl na virulenci.....	8
2.1.4 Detoxifikace mědi .....	9
2.2 <i>Trypanosoma brucei brucei</i> .....	10
2.2.1 Životní cyklus .....	10
2.2.2 Spavá nemoc .....	11
2.2.3 Energetický metabolismus <i>Trypanosoma brucei</i> .....	12
3 Cíle práce .....	18
4 Materiál a metody: .....	19
4.1 Kultivace buněk <i>Trypanosoma brucei</i> .....	19
4.1.1. Rozmražení a kultivace kultury .....	19
4.1.2. Zamražení kultur .....	20
4.2 Příprava polyklonální protilátky proti TbATPáze .....	20
4.2.1 Primery a plazmidy .....	20
4.2.2 Izolace genomové DNA .....	21
4.2.3 PCR.....	21
4.2.4 Izolace DNA fragmentů .....	21
4.2.5 Ligace do primárního plazmidu .....	21
4.2.6 Transformace do bakterií.....	22
4.2.7 Izolace transformovaného plazmidu .....	22
4.2.8 Vložení inzertu do pET42b .....	23
4.2.9 Ověření exprese pomocí indukce IPTG .....	24
4.2.10 Izolace proteinu za denaturačních podmínek .....	26
4.2.11 Příprava vzorků pro testování protilátky .....	28
4.2.12 Testování protilátky pomocí metody western blot .....	28
4.2.13 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii .....	29
4.3 Snížení exprese pomocí metody RNAi .....	29

4.3.1 RNA interference.....	29
4.3.2 Primery a plazmidy .....	30
4.3.3 PCR a ligace.....	30
4.3.4 Izolace DNA pro elektroporaci .....	31
4.3.5 Linearizace a přesrážení DNA .....	31
4.3.6 Elektroporace DNA do krevní formy <i>Trypanosoma brucei</i> .....	31
4.3.7 Elektroporace DNA do procyklické formy <i>Trypanosoma brucei</i> .....	32
4.3.8 Příprava buněk pro izolaci RNA .....	33
4.3.9 Izolace RNA z krevních a hmyzích forem <i>Trypanosoma brucei</i> .....	33
4.3.10 qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce).....	33
4.4 Lokalizace TbATPázy pomocí V5 značky .....	35
4.4.1 Primery a plazmidy .....	35
4.4.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii .....	35
4.4.3 Fluorescenční mikroskopie .....	36
4.5 Identifikace role genu pomocí funkční komplementace .....	36
4.5.1 Primery a plazmid .....	37
4.5.2 Kultivace kmenů <i>Saccharomyces cerevisiae</i> před transformací .....	37
4.5.3 Transformace do kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
4.5.4 Komplementace .....	39
4.6 Poloviční inhibiční koncentrace (IC <sub>50</sub> ).....	39
4.6.1 Příprava vzorků .....	39
4.6.2 Nasazení buněk do destičky a inkubace v resazurinu .....	39
4.7 Vliv mědi na fenotyp <i>Trypanosoma brucei</i> .....	41
4.8 Růstová křivka .....	42
4.9 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS).....	43
4.10 Hmotnostní spektrometrie .....	44
5 Výsledky .....	45
5.1 Příprava polyklonální protilátky proti TbATPáze .....	45
5.1.1 Purifikace TbATPázy s histidinovou značkou.....	45
5.1.2 Testování polyklonální protilátky.....	47
5.2 Snížení exprese pomocí metody RNAi .....	48
5.3 Lokalizace TbATPázy pomocí V5 značky .....	51
5.4 Charakterizace <i>tbatpázy</i> .....	53

5.5 Stanovení míry toxicity u <i>T. brucei</i> .....	53
5.6 Vliv TbATPázy na fenotyp <i>T. brucei</i> .....	55
5.7 Růstová křivka .....	56
5.8 Výsledky ICP-MS. ....	57
5.9 Výsledky hmotnostní spektrometrie.....	59
6 Diskuse.....	61
7 Závěr .....	66
8 Seznam použitých zkratk.....	67
9 Seznam použité literatury.....	68



# 1 Úvod

Před zhruba 2–3 miliardami let s nástupem kyslíkové atmosféry došlo k přeměně iontů  $\text{Cu}^+$  na více rozpustné ionty  $\text{Cu}^{2+}$ . Schopnost mědi měnit oxidační stav jí umožňuje podílet se na příjmu a odevzdávání elektronů v redoxních reakcích. Z tohoto důvodu je měď zcela esenciálním stopovým prvkem u většiny organismů. Na buněčné úrovni se měď podílí na anti-oxidativní obraně, metabolismu železa a energetickém metabolismu. Zároveň je koncentrace mědi v organismech přísně regulována, jelikož volné ionty mědi mohou vést až k buněčné smrti. Vzhledem k tomu si organismy napříč všemi říšemi vyvinuly detoxifikační aparát. Na detoxifikaci mědi se podílejí proteiny, které mají zachovalé konzervované struktury, mezi takové patří motivy vážící měď, bohaté na cystein a methionin. Vlastnosti mědi využívají buňky imunitního systému v boji s patogeny. Měď selektivně transportují do fagolysozomu, ve kterém se vyskytují kromě volných iontů mědi i další molekuly, např. reaktivní formy kyslíku (ROS) a oxid dusnatý (NO), podílející se na likvidaci patogenů.

Kvůli svým toxickým vlastnostem má měď schopnost snižovat virulenci parazitických organismů. Z tohoto důvodu se tato diplomová práce zaměřuje na výzkum transportu mědi u *Trypanosoma brucei*, původce spavé nemoci u člověka a onemocnění nagana u dobytka. Import a export mědi v buňce je naprosto esenciální, proto by jejich narušení mohlo vést až k buněčné smrti parazita. Vzhledem k postupnému vzniku rezistence k současným léčivům by právě měď mohla představovat potenciální léčebný přístup. Toxicita mědi není unikátní pro buňky parazitů, proto je třeba brát ohled na míru toxicity pro lidský organismus. Poměr účinku testované látky na patogenní organismus vůči toxicitě na hostitelské buňky se pak vyjadřuje selektivním indexem. Ionophory, selektivně přenášející měď přes membránu parazita, jsou jedním z možných léčiv.

V této práci jsme si kladli za cíl zjistit funkci TbATPázy, určit její lokalizaci, stanovit míru exprese tohoto proteinu v různých podmínkách, a také pomocí snížené exprese zjistit její vliv na celkový fenotyp *T. brucei*. Dále bylo testováno množství mědi u *T. brucei* a míra její toxicity na tento patogen.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Měď

Měď je přechodný prvek, který se v přírodě vyskytuje nejčastěji ve dvou oxidačních stavech  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Konverze mezi  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  představuje systém o vysokém redoxním potenciálu, kvůli tomu je měď důležitým kofaktorem řady enzymů během redoxních reakcí (Kaim a Rall 1996). Měď se účastní jako kofaktor například při procesu redukce superoxidů, v energetickém metabolismu nebo během metabolismu železa (Scheiber et al. 2013). Měď je též pevnou součástí proteinů např. hemocyaninu, jež se podílí na přenosu kyslíku u členovců a měkkýšů (Kaim a Rall 1996).

Mezi nejdůležitější enzymy vážící měď u *Homo sapiens* patří:

#### **Cytochrom C oxidáza (CcO)**

Tento enzym, označován též jako komplex IV, je součástí elektronového transportního řetězce (ETR). Vyskytuje se na vnitřní mitochondriální membráně, kde přebírá elektrony z redukovaného cytochromu c a předává je na kyslík, který je finálním akceptorem elektronů a dochází k jeho redukci na vodu (Scheiber et al. 2013). Při předávání elektronů z cytochromu c na CcO dochází k uvolnění redoxní energie, která je využita k transportu protonů z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie. Vytváří se tím protonový gradient, který je využit k syntéze ATP enzymem  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP syntázou (Popovic et al. 2010; Scheiber et al. 2013). CcO se vyskytuje u většiny organismů s výjimkou velkého množství anaerobních organismů, nesoucích redukované formy mitochondrie. Mezi takové organismy patří například cerkomonády (Gawryluk et al. 2016), *Trichomonas* spp. obsahující hydrogenosomy nebo *Entamoeba* spp a *Giardia* spp obsahující mitosomy (Muller 1993).

Savčí CcO může fungovat jako aktivní monomer, dimer či být součástí superkomplexu. Struktura CcO závisí na kardiolipinech, které se podílí na regulaci dýchacího řetězce (Shinzawa-Itoh et al. 2019). Monomer je kódován jaderným i mitochondriálním genomem a obsahuje celkově 14 podjednotek (Balsa et al. 2012). Tři podjednotky mitochondriálního původu mají funkční charakter, katalyzují reakci a přenášejí protony do mezimembránového prostoru mitochondrie. Podjednotky jaderného původu mají pravděpodobně regulační a stabilizační funkci (Diaz 2010). Snížená exprese podjednotek kódovaných jaderným genomem vede ke snížené aktivitě CcO a ke snížené afinitě ke kyslíku (Fornuskova et al 2010). Pro svou katalytickou funkci dále vyžaduje CcO prostetické skupiny: 2 hemy, 2 centra mědi, zinek a hořčík. Mutace nebo nedostatek CcO jsou spojovány u člověka s neurodegenerativními či svalovými onemocněními (Diaz 2010).

#### **Cu/Zn Superoxid dismutáza (Cu/Zn SOD)**

Tento enzym hraje klíčovou roli v obraně buněk proti poškození způsobenému reaktivními formami kyslíku (ROS). Vyskytuje se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrie (Okado-Matsumoto a Fridovich 2001), kde jako homodimer katalyzuje dismutaci superoxidových radikálů na peroxid vodíku a kyslík. Peroxid vodíku je dále

detoxifikován katalázou nebo glutathion peroxidázou za vzniku vody a kyslíku (Scheiber et al. 2013). SOD se vyskytuje u většiny organismů, leč absence tohoto enzymu byla zaznamenána u *Giardia intestinalis* (Brown et al. 1995). Mutace Cu/Zn SOD u člověka nese riziko neurodegenerativních poruch a amyotrofické laterální sklerózy (Scheiber et al. 2013).

### **Ceruloplasmin**

Tento enzym má u člověka klíčovou roli pro homeostázi železa a v přenosu mědi. Jedná se o glykoprotein, který je produkován v játrech a následně je vylučován do krevního oběhu (Hellman a Gitlin 2002). Ceruloplasmin vykazuje feroxidázovou aktivitu, kdy oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ , jenž dále slouží jako prostetická skupina pro transferin (Osaki et al. 1966). Funkce ceruloplasminu je úzce spjata s transportérem železa ferroportinem (De Domenico et al. 2007). Ferroportin je degradován v momentě, kdy v krevní plazmě převažuje forma ceruloplasminu bez mědi, aceruloplasmin, který nevykazuje feroxidázovou aktivitu. Železo se poté nepřenáší ze střeva do krevního oběhu, kvůli čemuž může docházet k nadměrnému ukládání železa v orgánech (De Domenico et al. 2007; Hellman a Gitlin 2002).

Snížená koncentrace ceruloplasminu v krevní plazmě je asociována s Wilsonovou chorobou. Absence či snížené množství ceruloplasminu se projevuje onemocněním zvaným aceruloplasminemie (Hellman a Gitlin 2002).

#### **2.1.1 Transport mědi**

Měď je esenciálním prvkem v mnoha enzymatických reakcích, a proto je důležité přísně regulovat její hladinu v biologických systémech. V rámci rozsáhlého tématu metabolismu mědi je pozornost věnována transportu tohoto prvku, který je zásadní součástí jeho fungování. Tato kapitola diplomové práce se zaměřuje na vybrané proteiny, které hrají klíčovou roli v transportu mědi. Konkrétně jsou tyto informace založeny zejména na výzkumu provedeném na modelových organismech *Saccharomyces cerevisiae* a *Homo sapiens*.

#### **ATPázy P1B typu**

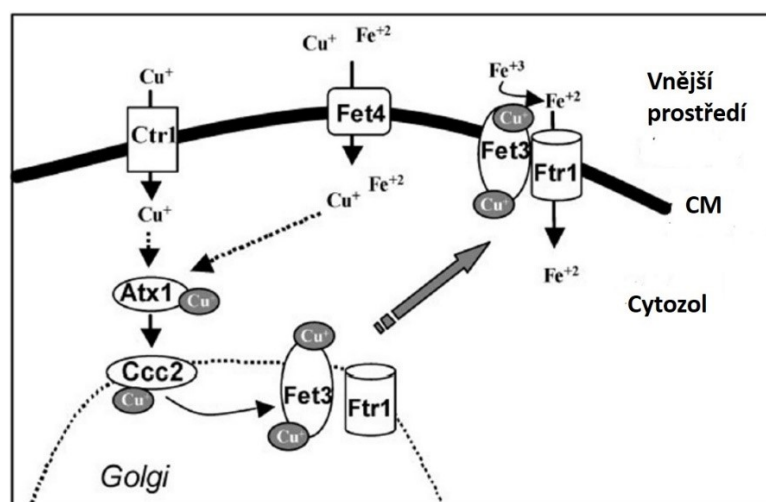
Jedná se o typ ATPáz, které přenáší ionty mědi za hydrolýzy ATP. Ve své aminokyselinové struktuře obsahují konzervovaný motiv CXXC, vážící měď (Boal a Rosenzweig 2009). Vyskytují se u eukaryotních i prokaryotních organismů (Inesi et al. 2014). U eukaryot ATPázy P1B typu můžeme pozorovat v trans-Golgi aparátu (trans-GA) a cytoplazmatické membráně (CM) (Lutsenko a Petris 2003), kde kontrolují intracelulární hladinu mědi (Petris et al. 1996). U prokaryot se nachází tyto ATPázy v cytoplazmě a v membránách (Rensing et al. 2000; Solioz a Odermatt 1995). Prokaryotickým a některým eukaryotickým organismům slouží ATPáza P1B typu zejména při detoxifikaci mědi. Její funkcí je pumpovat nadbytek volných iontů mědi ven z buňky a zamezit tak jejím toxickým účinkům (Kap. 2.1.2), díky čemuž dokáže prokaryota a některá protista přežít v prostředích o vysoké koncentraci mědi (Chan et al. 2010) a účinně se bránit imunitnímu systému (Paul et al. 2021; Weissman et al. 2000). Mezi parazitické organismy, u kterých byla zjištěna role ATPázy P1B typu při detoxifikaci mědi, patří například *Leishmania major* (Paul et al. 2021), dále

*Plasmodium falciparum* (Rasoloson et al. 2004), *Naegleria fowleri* (Grechnikova et al. 2020) a *Candida albicans* (Weissman et al. 2000).

Ke známým ATPázám P1B typu (dále ATPázy P1B typu) patří ATP7A a ATP7B u *H. Sapiens*, které mají podobnou funkci, ale liší se expresí ve tkáních. ATP7A je exprimována zejména v buňkách střevní sliznice a endotelu hematoencefalické bariéry, zatímco ATP7B je exprimována především v játrech. Obě ATPázy se podílejí na přenosu mědi z trans-GA do cílových proteinů, kterými může být tyrosináza či ceruloplasmin. Při nadměrné koncentraci mědi je ATP7A lokalizována též v CM, kde se aktivně podílí na vyloučení mědi z buněk, zatímco ATP7B se přesouvá z trans-GA do cytoplazmatických váčků, které vylučují měď z buňky. (Lutsenko a Petris 2003).

Mutace v některých ATPázách P1B typu způsobují některá genetická onemocnění. Mutace v ATP7A vede ke vzniku Menkeseho choroby a v případě ATP7B k Wilsonově chorobě (Argüello et al. 2007). Pro obě choroby je charakteristické nadměrné ukládání mědi v tkáních v důsledku jejich absence. To může vést u Wilsonovy choroby k neurologickým a jaterním poruchám a u Menkeseho choroby k neurodegeneraci a k abnormalitám v pojivových tkáních (Argüello et al. 2007).

Homologem lidských ATPáz typu P1B u *S. cerevisiae* je protein CCC2 (Copper-transporting ATPase). Ten transportuje měď z trans-GA do multicopper oxidázy FET3 (homolog ceruloplasminu, iron transport multicopper oxidase), která umožňuje příjem železa do buňky (**Obr. 1**) (Serrano et al. 2004). Mezi další známé prostudované ATPázy P1B typu patří CopA, která se vyskytuje např. u *Escherechia coli* (Rensing et al. 2000). V nedávné době byly objeveny ATPázy typu P1B u některých parazitů, například *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020), *Trypanosoma* spp. (Isah et al. 2020) nebo *L. major* (Paul et al. 2021).



Obrázek 1. Role CCC2 (Copper-transporting ATPase) v příjmu železa do buňky. Měď ve formě  $\text{Cu}^{1+}$  vstupuje do buňky pomocí transportéru Ctr1 (Copper transporter 1). Poté je pomocí chaperonu Atx1 (Antioxidant protein 1) přenesena k CCC2 v Golgiho aparátu, odkud je měď přenesena na Fet3 (Iron transport multicopper oxidase), který je odpovědný za příjem železa u *S. cerevisiae*, jelikož redukuje ionty železa  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ , jež přenáší transportér Ftr1 (Plasma membrane iron permease) do buňky. Upraveno a převzato od Serrano et al. (2004).

U rodu *Trypanosoma* byly identifikovány ATPázy P1B typu u poddruhu *T. brucei brucei* NTbbCuATPase (dále TbATPáza; Tb927.11.1260), a *T. brucei congolense* (NTcoCuATPase; TcIL3000.11.1210). TbATPáza obsahuje 8 transmembránových domén a 2 domény vážící těžké kovy (HM-binding domains) s charakteristickým motivem CXXC vážící měď na N-konci. Protein je velký 95 kDa (Isah et al. 2020), což se liší oproti predikované velikosti 102 kDa ve vnitřní databázi pro *T. brucei* TriTrypDB (Amos et al. 2022). *In vitro* i *in vivo* byla u tohoto proteinu prokázána schopnost přijímat ionty mědi  $\text{Cu}^+$  (Isah et al. 2020). Lokalizace této ATPázy zatím není jasná. Mohla by se vyskytovat v neznámé organelle, a zároveň být součástí plazmatické membrány (Isah et al. 2020).

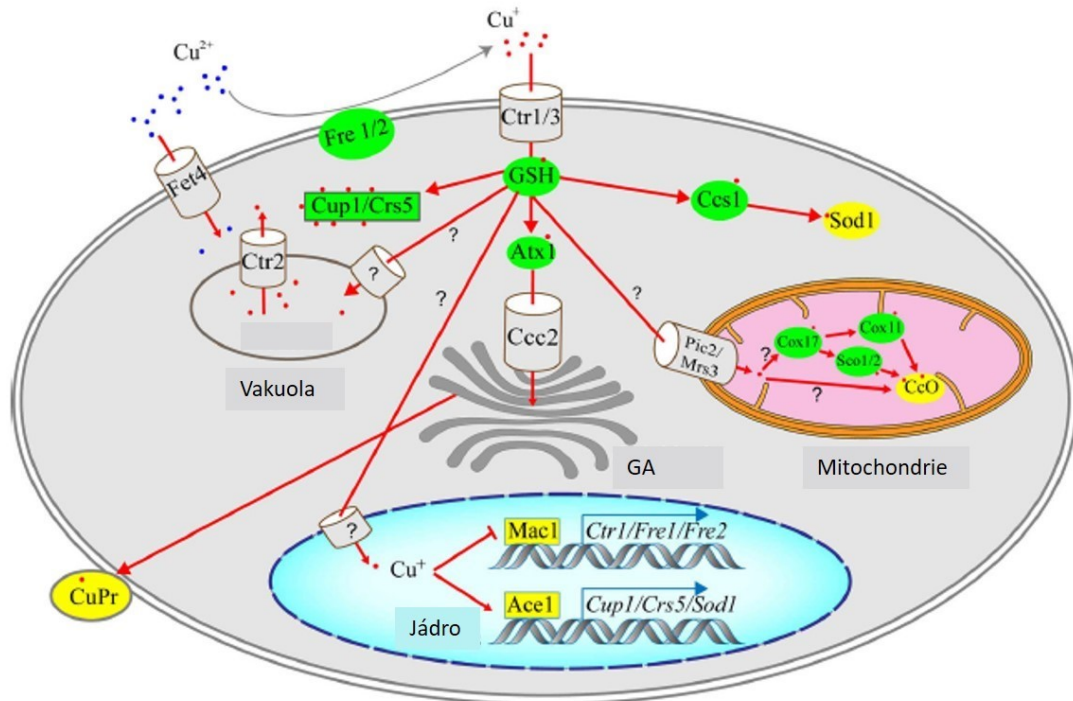
ATPáza P1B typu *L. major* (LmATP7) obsahuje tři domény vážící těžké kovy (HM-binding domains). Každá z těchto domén obsahuje charakteristický motiv CXXC pro vázání mědi na N-konci (Paul et al. 2021). Vyskytuje se převážně v CM a v menší míře v intracelulárních strukturách, odkud by mohla přenášet měď do cílových proteinů. Měď by mohla být přenášena do trans-Golgiho aparátu a dalších buněčných organel, např. glykosomu, kde se vyskytuje Cu/Zn SOD. Exprese LmATP7 je regulována koncentrací mědi (Paul et al. 2021).

V podmínkách zvýšené koncentrace mědi byl obsah mědi v buňkách *L. major* se zvýšenou expresí LmATP7 (LmATP7-OE) 3x nižší než u divokého „wild type“ kmene (dále WT), zatímco u heterozygotních mutantů pro ATPázu P1B typu byl obsah mědi 3x vyšší oproti WT. Dále byla zaznamenána vyšší rychlost množení buněk LmATP7-OE oproti WT v podmínkách zvýšené koncentrace mědi. Pomocí funkční komplementace se též podařilo určit funkci ATPázy homologické CCC2. LmATP7 hraje mimo jiné klíčovou roli v přežití a infektivitě amastigotních stádií. Exprese ATPázy je oproti promastigotním stádiím u amastigotů 35x zvýšena. LmATP7-OE amastigoti vykazovali též vyšší odolnost vůči mědi v makrofázích, kdy infikovali o 20 % více makrofágů než WT. Výsledky této studie naznačují, že LmATP7 pravděpodobně hraje esenciální roli při detoxifikaci a v homeostázi mědi v buňce *L. major* (Paul et al. 2021).

### **Copper transporter (CTR)**

CTR jsou membránové proteiny specializující se na import iontů mědi ve formě  $\text{Cu}^+$  u eukaryotických organismů. Obsahují tři transmembránové domény. Součástí domén jsou aminokyselinové motivy bohaté na methionin jako je MXM, M2XM, nebo MX3M, které jsou klíčové pro příjem mědi (Labbé et al. 1999; Ren et al. 2019). Měď v prostředí se často vyskytuje ve formě  $\text{Cu}^{2+}$ , a proto musí být redukována pomocí metaloreduktáz Fre1/2 (Ferric/cupric reductase transmembrane component 1/2), aby mohla být přijata CTR (Georgatsou et al. 1997). Transkripce CTR transportérů je regulována intracelulární koncentrací mědi (Dancis et al. 1994b). V buňkách *S. cerevisiae* byly identifikovány tři proteiny rodiny těchto transportérů (CTR1-3). CTR1 a CTR3 jsou vysokoafinitní hlavní přenašeče mědi v buňce (Andrews 2001). CTR2 je nízkoafinitní přenašeč, který se podílí na exportu mědi z vakuol (**Obr. 2**) (Shi et al. 2021). Laboratorní kmen *S. cerevisiae* BY4742

neobsahující CTR3 (Knight et al. 1996) měl při odstranění genu pro CTR1 nedostatečný příjem mědi, vedoucí ke snížené aktivitě Cu/Zn SOD (Dancis et al. 1994a) a CcO (Shi et al. 2021). U *H. sapiens* jsou přítomny homology CTR1 a CTR2.



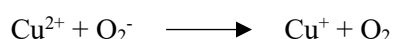
Obrázek 2. Transport mědi u *S. cerevisiae*. Měď je ve formě  $\text{Cu}^{2+}$  nejdříve redukována metaloreduktázami Fre1 a Fre2 na  $\text{Cu}^{1+}$ , aby byla následně majoritně přijata pomocí vysokoafinitních transportérů CTR1 a CTR3. Dalším transportérem mědi je nízkoafinitní transportér Fet4. Měď dále putuje ke glutathionu (GSH), který měď transportuje k dalším chaperonům nebo metalothioneinům Cup1 a CRS5, které sekvestrují měď. Mezi chaperony, které přijímají měď od GSH, patří Atx1, který měď dále přesouvá na ATPázu PIB typu CCC2, jež přenáší měď na cílové proteiny. Chaperon Ccs1 přenáší měď na Cu/Zn SOD (Sod1), která se podílí na antioxidantivní obraně. Za přenos mědi z GSH do mitochondrie zodpovídají chaperony Pic2 a Mrs3. Měď následně putuje přímo na CcO nebo nepřímo pomocí chaperonů COX17, COX11 a SCO1 nebo SCO2. Kromě sekvestrace je při přítomnosti volných iontů mědi  $\text{Cu}^{1+}$  měď akumulována ve vakuole a pomocí transportéru CTR2 je vylučována ven z buňky. Transport mědi do vakuol a jádra není známý. Geny odpovědné za homeostázi mědi jsou regulovány transkripčními faktory Ace1 a Mac1. Přítomnost volných iontů mědi  $\text{Cu}^{1+}$  aktivuje Ace-1, což vede ke zvýšené expresi genů podílejících se na detoxifikaci mědi (cup1, crs5, sod1) a inhibuje Mac1 zodpovědný za zvýšenou expresi genů podílejících se na importu mědi (ctr1 a ctr3). Upraveno a převzato od Shi et al. (2021).

Mechanismus importu mědi do buněk *T. brucei* zatím není znám, jelikož genom *T. brucei* neobsahuje žádné homology přenašeče CTR nebo homolog Atx1. Nicméně je možné, že měď přijímají od hostitele z ceruloplasminu. (Isah et al. 2020). Jelikož ceruloplasmin váže ionty mědi v podobě  $\text{Cu}^{2+}$ , lze předpokládat přítomnost homologu metaloreduktáz Fre1/2, které redukují ionty  $\text{Cu}^{2+}$  za tvorby iontů  $\text{Cu}^{1+}$ . Ty jsou přístupné pro neznámý přenašeč, jež transportuje  $\text{Cu}^{1+}$  k ATPáze PIB typu pro další využití (Georgatsou et al. 1997;

Isah et al. 2020). U kmene 427 *T. brucei* se v TriTrypDB vyskytují homology Fre2 (Tb427\_110049400 a Tb427tmp.02.1990) (Amos et al. 2022; The UniProt Consortium 2023).

### 2.1.2 Toxicita mědi

Obecně se předpokládá, že volné ionty mědi mohou *in vitro* reagovat s kyslíkem za tvorby ROS, které se podílejí na tvorbě oxidativního stresu v buňkách. Nezpracované volné ionty mědi jsou pro buňku nebezpečné, poněvadž se neustále podílí na tvorbě ROS. Konkrétně se měď může podílet na tvorbě nejreaktivnější formy ROS, hydroxylového radikálu prostřednictvím Fentonovy reakce (Ozawa a Hanaki 1991):

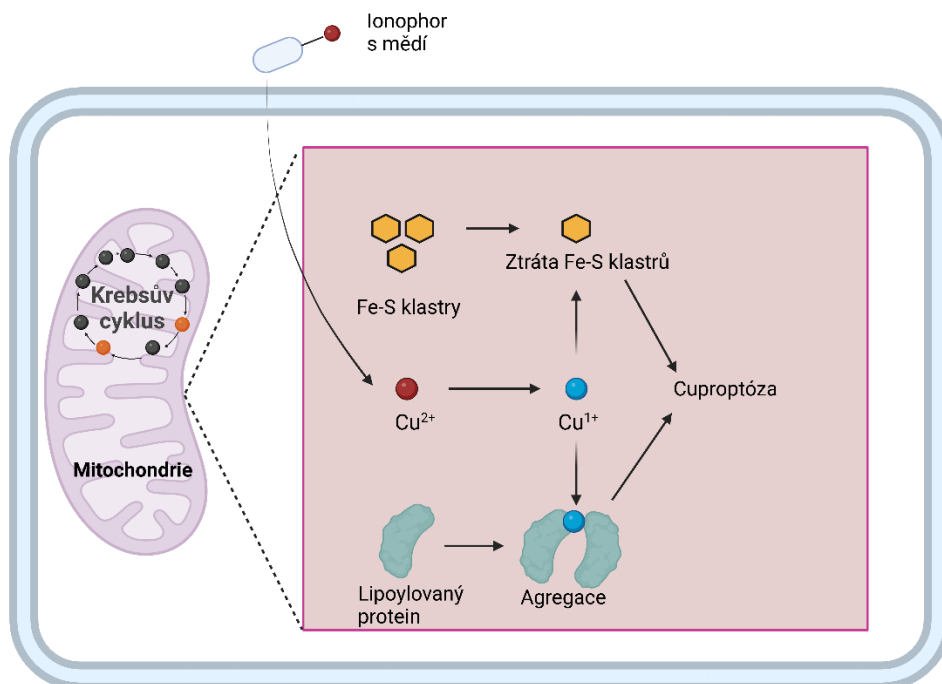


ROS vznikající v reakci s mědí mohou indukovat apoptózu buňky (Kawakami et al. 2008). Podobný výsledek *in vivo* byl zaznamenán u kvasinek *S. cerevisiae* (Liang a Zhou 2007).

Měď se může také nescificky vázat na DNA či jiné biomolekuly a narušit jejich funkci či strukturu. Mezi takové biomolekuly mohou patřit lipoylované proteiny, které jsou důležitou součástí Krebsova cyklu. Měď indukuje agregaci těchto proteinů. Dále se měď aktivně váže na proteiny obsahující Fe-S klastry (Tsvetkov et al. 2022). Příkladem Fe-S proteinů mohou být dehydratázy. Měď vazbou na sírové atomy uvolňuje železo, a tím dochází ke ztrátě Fe-S klastrů a poškození funkce daných proteinů (Macomber a Imlay 2009). Tento proces vede až k buněčné smrti označované jako „cuproptóza“ (Tsvetkov et al. 2022).

Cuproptóza by se mohla stát terapeutickým cílem v boji proti rakovině. Ionophory (elescomol, disulfiram) by mohly dopravit měď do mitochondrií rakovinných buněk a způsobit tím buněčnou smrt metastázujících buněk (**Obr. 3**) (Chen et al. 2022). Dalším řešením by mohlo být využití komplexů s mědí, které by inhibovaly činnost proteasomu u rakovinných buněk (Chen et al. 2021).

Ionophory s mědí by se mohly využít dále v léčbě parazitárních onemocnění. V Laboratoři esenciálních kovů a designu nových léčiv byly testovány ionophory s mědí u parazitické amfizoické améby *N. fowleri*. Ionophory pyrithion sulfid, disulfiram a 8-hydroxychinolin účinně inhibovali růst *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020).

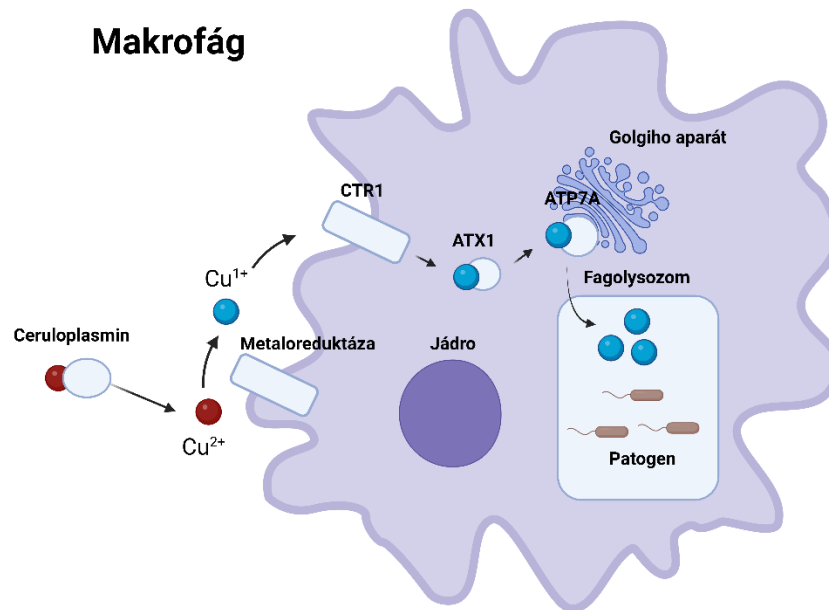


Obrázek 3. Zjednodušené a přeložené schéma navození cuproptózy v mitochondrii. V Krebsově cyklu jsou oranžově označeny meziprodukty sukcinát a alfa-ketoglutarát, které figurují v dráze kyseliny lípoové. Měď v mitochondrii indukuje agregaci lipoylovaných proteinů a zároveň se váže na Fe-S klastry, což vede k jejich ztrátě v daných proteinech. Vytvořeno v BioRender.com podle Chen et al. (2022).

### 2.1.3 Měď a její podíl na virulenci

Měď je pro své toxické vlastnosti využívána imunitními buňkami v boji proti patogenům. Během infekce dochází k zvýšené koncentraci mědi v krevním séru prostřednictvím ceruloplasminu (Culbertson et al. 2020). Makrofágy přijímají měď pomocí CTR1 transportéru. Měď je poté dopravena k ATPáze P1B typu APT7A, která ji následně dopraví do fagolysozomu. Akumulaci mědi ve fagolysozomu využívají makrofágy toxických vlastností mědi v boji proti patogenům (**Obr. 4**). Nicméně, patogenní organismy si vyvinuly různé detoxifikační mechanismy (Murdoch a Skaar 2022).





Obrázek 4. Přenos mědi z krevního séra do makrofágu. Během infekce dochází ke zvýšení koncentrace mědi v krevním séru. Ceruloplasmin transportuje měď k metaloreduktáze, která redukuje ionty mědi na dostupnou formu  $\text{Cu}^{1+}$  pro CTR1 transportér. Následuje transport mědi k ATP7A pomocí chaperonu ATX1. Měď je pomocí ATP7A přenesena do fagolysozomu, kde je využíváno toxických vlastností mědi k usmrcení patogenů. Vytvořeno v BioRender podle Murdoch a Skaar (2022).

#### 2.1.4 Detoxifikace mědi

Nadbytek mědi pro buňku je velmi nebezpečný. Volné ionty mědi se mohou podílet na tvorbě ROS a vázat se nespecificky na biomolekuly, a tím vyvolat buněčnou smrt.

Buňka musí obsahovat specifické proteiny, které kontrolují intracelulární koncentraci mědi. Jedny z takových proteinů jsou metalochaperony, které transportují měď k specifickým cílovým proteinům (Rosenzweig 2001). Při toxické koncentraci mědi jsou důležité chaperony mědi CCS a ATX1, které transportují měď k ATPáze P1B typu a Cu/Zn SOD (**Obr. 2**) (Shi et al. 2021).

Další významnou skupinou proteinů, která se podílí na detoxifikaci mědi, jsou metalothioneny. Jedná se o konzervované nízkomolekulární proteiny, které obvykle obsahují aminokyselinové motivy bohaté na cystein, vázající ionty mědi  $\text{Cu}^+$ . Metalothioneny můžeme nalézt u prokaryotických i eukaryotických organismů (Calvo et al. 2017). U prokaryotických organismů hrají důležitou roli při exportu a sekvestraci volných iontů mědi. Příkladem může být grampozitivní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Při infekci je fagocytována makrofágy imunitního systému do fagolysozomu. Odpovědí *M. tuberculosis* je zvýšená exprese metalothioneinu MymT, který pomáhá měď inaktivovat a zabraňuje tak potenciální tvorbě ROS a likvidaci životně důležitých Fe-S klastrů (Gold et al. 2008).

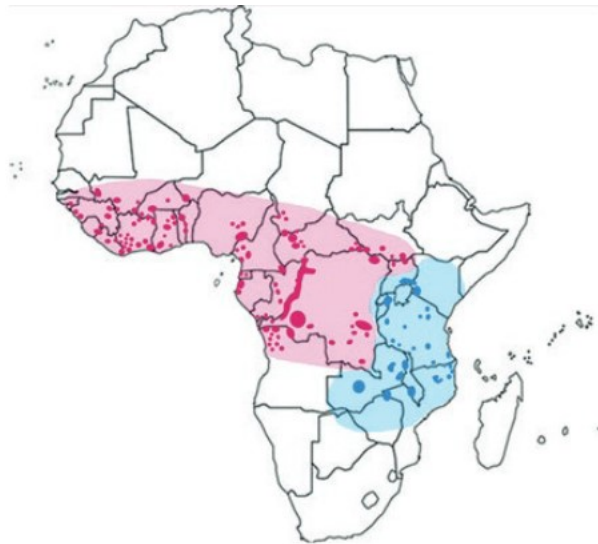
Obdobná funkce metalothioneinů je též u eukaryot. Příkladem může být metalothionein CUP1 popsaný u kvasinky *S. cerevisiae*, jehož exprese byla zvýšena v podmínkách zvýšené koncentrace mědi. Společně s dalším metalothioneinem CRS5 umožňují kvasinkám přežít ve zvýšených koncentracích mědi (Butt et al. 1984).

Na detoxifikaci mědi má též zásadní vliv molekula glutathion (GSH). Tento tripeptid se tradičně podílí na detoxikaci ROS (Birben et al. 2012). Zároveň se zásadně podílí na sekvestraci mědi, kterou přijímá od transportérů CTR a předává je dále ke zpracování metalothioneinům (Jomova et al. 2010). Aktivně se váže na volné ionty mědi za tvorby komplexu GSH-Cu, kdy následně měď poskytuje jiným chaperonům **(Obr. 2)** (Banci et al. 2010).

## 2.2 *Trypanosoma brucei brucei*

V této práci byl zkoumán druh *T. brucei brucei*, který lze snadno kultivovat *in vitro* a jsou u něj zavedeny metody molekulární biologie. Tento organismus je řazen do kmene Euglenozoa, třídy Kinetoplastea, řádu Trypanosomatida a rodu *Trypanosoma*, kde je součástí komplexu *Trypanosoma brucei*. Jedná se o jednobuněčný bičíkatý organismus, který obsahuje jednu mitochondrii a charakteristický útvar kinetoplast, obsahující mitochondriální DNA.

*T. brucei brucei* způsobuje onemocnění u dobytka zvané nagana. Toto onemocnění postihuje více než milión kusů dobytka ročně (Nyimba et al. 2015), což vede k výrazným ekonomickým ztrátám. Ročně se odhaduje ztráta čtyř až pěti bilionů dolarů pro africké země (Kargbo et al. 2022). Do komplexu *Trypanosoma brucei* řadíme další dva poddruhy *T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense*. Oba zmíněné poddruhy způsobují spavou nemoc u *H. sapiens*. Zástupci komplexu *Trypanosoma brucei* se vyskytují v subsaharském pásmu **(Obr. 5)**. Výskyt je závislý na přítomnosti mouchy Tse-tse (*Glossina* spp.), jež přenáší parazita na savčího hostitele.



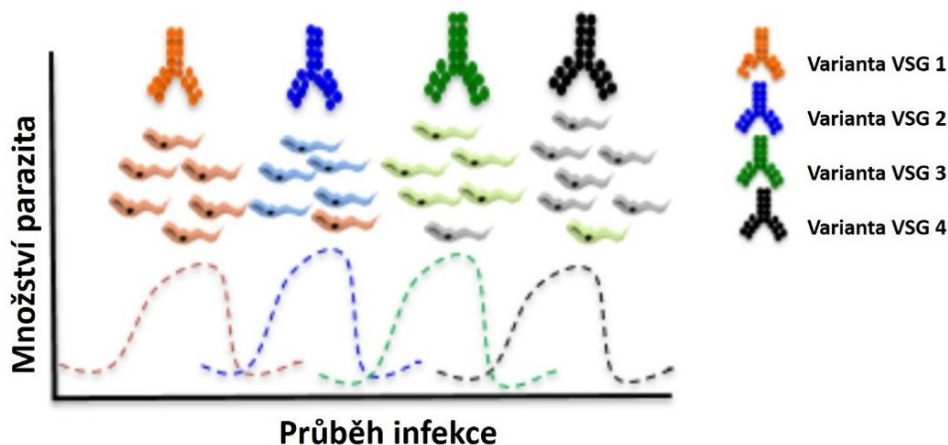
Obrázek 5. Mapa zobrazující výskyt afrických trypanosom. Červeně je výskyt *Trypanosoma b. gambiense*, modře výskyt *T. b. rhodesiense*. *T. b. brucei* se vyskytuje v modré i červené oblasti subsaharské Afriky. Jednotlivé vyznačené body zobrazují ohniska spavé nemoci pro konkrétní poddruh. Převzato od Steverding (2017).

### 2.2.1 Životní cyklus

*T. brucei* má digenetický životní cyklus probíhající mezi savčím hostitelem a hmyzím přenašečem. Během sání moucha Tse-tse ze svých slin injikuje parazita ve stádiu

metacyklických trypanomastigotů do pojivové tkáně kůže hostitele. V hostiteli se během 2-4 týdnů parazit přemění na podlouhlé, aktivně se množící „long slender“ trypanomastigoty a pomocí lymfatických cest a krve se dostává do jiných tkání v hostiteli. Někteří long slender trypanomastigoti se v hostiteli nemnoží a přeměňují se na krátké „stumpy“ trypanomastigoty, kteří jsou infekční pro přenašeče. V hmyzím přenašeči se stumpy formy přeměňují na procyklické trypanomastigoty ve středním střevě, odkud putují do slinných žláz, kde dochází k přeměně na množící se epimastigoty. Ve slinných žlázách se epimastigoti přeměňují na nedělící se metacyklické trypanomastigoty, kteří jsou infekční pro savčího hostitele.

Long slender trypanomastigoti se chrání před imunitou hostitele pomocí variabilního povrchového glykoproteinu (VSG), který zajišťuje jejich antigenní variabilitu. Imunitní obrana spočívá zejména v tvorbě protilátek proti VSG *T. brucei*, které jsou schopny eliminovat parazita (Donelson 1998). Protilátky jsou schopny v danou chvíli selektivně zničit většinou populaci, avšak se zvyšujícím se množstvím selektivních protilátek malá populace buněk přepne na expresi jiné varianty VSG. Tato varianta se následně stává majoritní. Tento cyklus se opakuje, dokud nedochází k vyčerpání imunitního systému savčího hostitele (**Obr. 6**). Při přeměně VSG je parazit zranitelný pouze za přítomnosti časných IgM protilátek a pouze po omezenou dobu. Vzhledem k jeho antigenní variabilitě není doporučeno proti tomuto proteinu vytvářet vakcíny (Pinger et al. 2017).



Obrázek 6. *Průběh infekce T. brucei v savčím hostiteli.* Během infekce se protilátky váží na majoritní formu VSG *T. brucei*, avšak při zvýšeném množství majoritní formy VSG (varianta VSG1) menší část buněk *T. brucei* změní formu VSG (varianta VSG 2). Kvůli čemuž protilátky nedokáží protilátky eliminovat celou populaci parazita. Z minoritní populace s odlišnou formou VSG (varianta VSG 2) se stává majoritní forma a cyklus pokračuje. Tento proces má za následek vyčerpání imunitního systému savčího hostitele. Převzato a upraveno od Moreno et al. (2019).

### 2.2.2 Spavá nemoc

Spavá nemoc se vyskytuje ve dvou odlišných formách. V 92 % případů se setkáme s chronickou variantou způsobenou infekcí *T. brucei gambiense*. Jedná se o mírnější variantu, kdy se u člověka mohou projevit symptomy až po několika měsících. Ve zbylých případech se jedná o akutní variantu způsobenou *T. brucei rhodesiense*. U této varianty se příznaky

projevují již po několika týdnech po infekci. Obě varianty jsou smrtící, pokud nejsou léčeny (WHO 2024).

Spavá nemoc probíhá ve dvou fázích. První fáze je známá jako hemolymfatická. Parazit se vyskytuje v lymfatických cévách a krevním systému. Druhá fáze, též nazývaná meningo-encefalitická, nastává v okamžiku, kdy trypanosoma aktivně proniká skrze hemato-encefalitickou bariéru do centrální nervové soustavy. V první fázi onemocnění může zpočátku v místě infekce vzniknout trypanosomový šankr. Mezi další příznaky patří horečnaté záchvaty, bolesti hlavy, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, edém, endokrinní dysfunkce, svědění a bolesti kloubů. Druhá fáze se projevuje noční nespavostí, hypertonicitou či hypotonicitou, ataxií, akinezií a problémy s mluvou. Dochází též ke změně chování. Mezi takové změny patří melancholie, apatie, zvýšená agresivita, porucha pozornosti či demence (Steverding 2017).

Onemocnění způsobené *T. brucei gambiense* a *rhodesiense* je podobné, nicméně liší se v některých aspektech. Trypanosomový šankr se vyskytuje zejména v případě nákazy *T. b. rhodesiense*, u *T. b. gambiense* se jedná o výjimečné případy (Büscher et al. 2017).

Počet případů spavé nemoci každoročně klesá, momentálně se jedná o stovky případů ročně. Nicméně je důležité nemoc monitorovat, aby nedošlo ke vzniku epidemie podobné v 70. letech minulého století (WHO 2024).

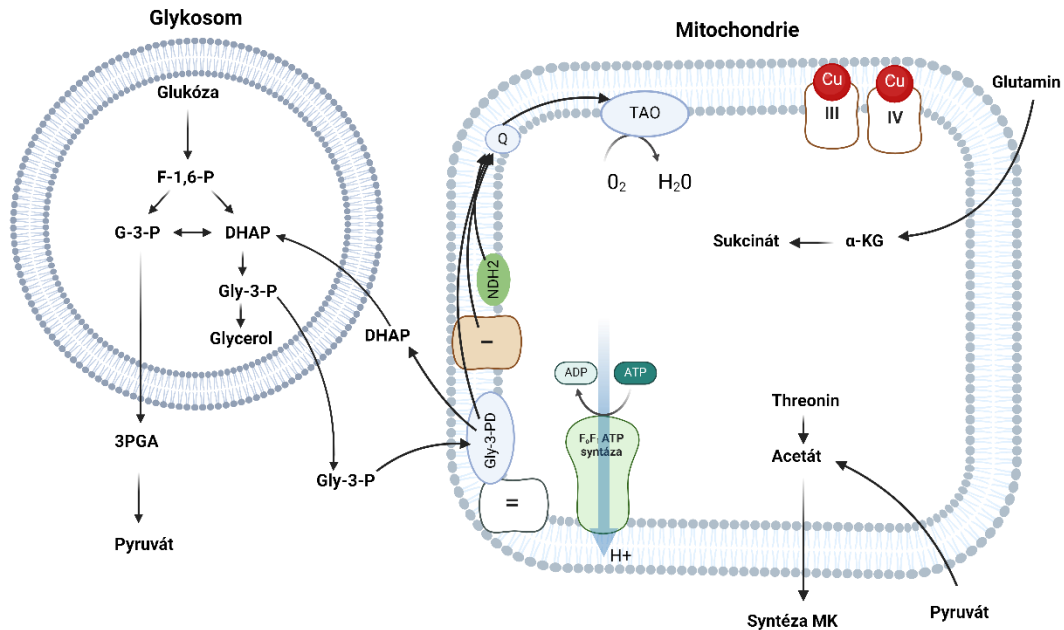
Výběr vhodné léčby závisí na variantě a fázi nemoci, ve které se pacient nachází. Pacienti jsou sledováni po dobu 2 let, během kterých podstupují laboratorní testy včetně odběru mozkomíšního moku. Pro chronickou variantu se v první fázi používají léčiva pentamidin a eflornitin. Tato léčiva se podávají intravenózně. Dále jsou k dispozici léčiva nifurtimox, který se užívá společně s eflornitinem ve druhé fázi onemocnění, a fexinidazol, který se podává zejména v první fázi. Výhoda těchto léčiv spočívá v perorálním podání. Pro akutní formu se v první fázi podává do pacienta intravenózně suramin a v druhé fázi melarsoprol. Avšak melarsoprol, derivát arzenu, je pro pacienta toxický. V nejhorším případě dochází až k encefalopatii, která je až v 10 % případů smrtící (WHO 2024). Toxický účinek nifurtimoxu a fexinidazolu je aktivován nitroreduktázami. Snížená exprese nitroreduktáz vede k rezistenci u *T. brucei*. Vzhledem k častým vznikům rezistence u parazitických organismů je důležité hledat nová léčiva. Novými potenciálními terapeutiky by mohly být ionophory. Jedná se o molekuly, které přenáší ionty kovů skrze membrány, v důsledku čehož by došlo k narušení homeostáze buňky vedoucí k buněčné smrti (Alfonso, 2013). V budoucnosti by mohly být testovány ionophory obsahující měď. Během testování je zcela zásadním kritériem selektivní index, jež porovnává terapeutický účinek na patogenní organismus a toxicitu na hostitelské buňky.

### 2.2.3 Energetický metabolismus *Trypanosoma brucei*

*T. brucei* vyskytuje ve dvou zcela odlišných prostředích. V savčím hostiteli se vyskytuje v krvi bohaté na glukózu, což jim umožňuje používat pouze glykolýzu. V hmyzím přenašeči je koncentrace glukózy nízká, a tak přechází patogen k oxidativní fosforylaci, kde hlavním substrátem pro energetický metabolismus je prolin.

## Krevní forma *Trypanosoma brucei*

Majoritním zdrojem energie pro tvorbu ATP v krvi je glukóza (Ryley 1956). Ta je metabolizována v glykolýze, která představuje hlavní energetickou dráhu (**Obr. 7**).



Obrázek 7. Zjednodušené znázornění vybraných drah energetického metabolismu krevní long slender formy *T. brucei*. Zde je uvedena hlavní glykolytická dráha, která probíhá zejména v glykosomu. Dále je součástí této dráhy důležitý glycerol-3-fosfátový člunek, propojující glykosom a mitochondrii, který přenáší elektrony pomocí glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (Gly-3-PD) na ubiquinon (Q) a dále glycerol-3-fosfátový člunek reoxiduje NADH v glykosomu. Hlavním metabolitem pro velmi zkrácený Krebsův cyklus je alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG). V mitochondrii dochází též k syntéze acetátu, který je důležitým prekurzorem pro syntézu mastných kyselin. Dále se v mitochondrii vyskytuje elektronový transportní řetězec, ve kterém jsou oproti hmyzí formě ve velmi malém množství komplexy II, III a IV, které nejsou součástí hlavního toku elektronů. Elektrony jsou přeneseny na ubiquinon kromě glycerol-3-fosfátového člunku pomocí alternativní dehydrogenázy (NDH2) a nejspíš i komplexu I. Ubichinon pak přenáší elektrony na trypanosomovou alternativní oxidázu (TAO). NDH2 a TAO neprodukují protonmotivní sílu, a proto mají krevní formy F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP syntázu fungující v opačném směru, která hydrolyzuje ATP za tvorby protonového gradientu. Zkratky použité v obrázku: F-1,6-P (fruktóza-1,6-bisfosfát); G-3-P (glyceraldehyd-3-fosfát); Gly-3-P (glycerol-3-fosfát); DHAP (dihydroxyacetonfosfát); 3PGA (3-fosfoglycerát); Gly-3-PD (glycerol-3-fosfát dehydrogenáza); NDH2 (alternativní dehydrogenáza); Q (ubichinon); TAO (trypanosomální alternativní oxidáza);  $\alpha$ -KG ( $\alpha$ -ketoglutarát); MK (mastné kyseliny). Upraveno podle Zíková et al. (2017) a vytvořeno v BioRender.com.

Prvních sedm reakcí glykolýzy u *T. brucei* probíhá v glykosomech, zatímco přeměna 3-fosfoglycerátu na pyruvát se odehrává v cytoplasmě (Oppendoes a Borst 1977). V glykosomech se udržuje redoxní rovnováha NAD<sup>+</sup>/NADH pomocí glycerol-3-fosfátového člunku. Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (Gly-3-PD) přeměňuje glycerol-3-fosfát (Gly-3-P) na dihydroxyaceton (DHAP) a současně reoxiduje NADH v glykosomu, přičemž elektrony jsou přenášeny do dýchacího řetězce k ubiquinonu (Albert et al. 2005). Pyruvát je hlavním koncovým produktem a z buňky je vyloučen pomocí pyruvátových přenašečů MPC 1/2 nebo přenesen do mitochondrie (Štáfková et al. 2016).

Glukóza není jediným přijímaným substrátem, mezi další patří threonin a glutamin (Mazet et al. 2013; Johnston et al. 2019). Threonin a pyruvát jsou v mitochondrii přeměňovány na acetát (Mazet et al. 2013). Acetát je poté transportován do cytoplazmy, kde je přeměněn acetyl-CoA syntetázou na acetyl-CoA, který slouží k syntéze mastných kyselin (Rivière et al. 2009). Glutamin vstupuje do velmi zkrácené části Krebsova cyklu, kde je nejprve přeměněn na alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG), který je poté přeměněn na sukcinát za produkce ATP (Johnston et al. 2019).

V minulosti se předpokládalo, že elektronový transportní řetězec je výrazně redukovaný (Opperdoes a Borst 1977). Srovnání proteomů mitochondrií krevní a hmyzí formy ukázalo, že se od sebe zas tak výrazně neliší. Mitoproteom krevní formy se s mitoproteomem hmyzí formy shodoval z 80 %. Krevní forma obsahuje kompletní sadu komplexů dýchacího řetězce, avšak u komplexů II, III a IV byla snížena exprese než u hmyzí formy. To naznačuje, že je tento parazit schopen rychlých změn či úprav svého metabolismu v odpovědi na změnu prostředí (Zíková et al. 2017).

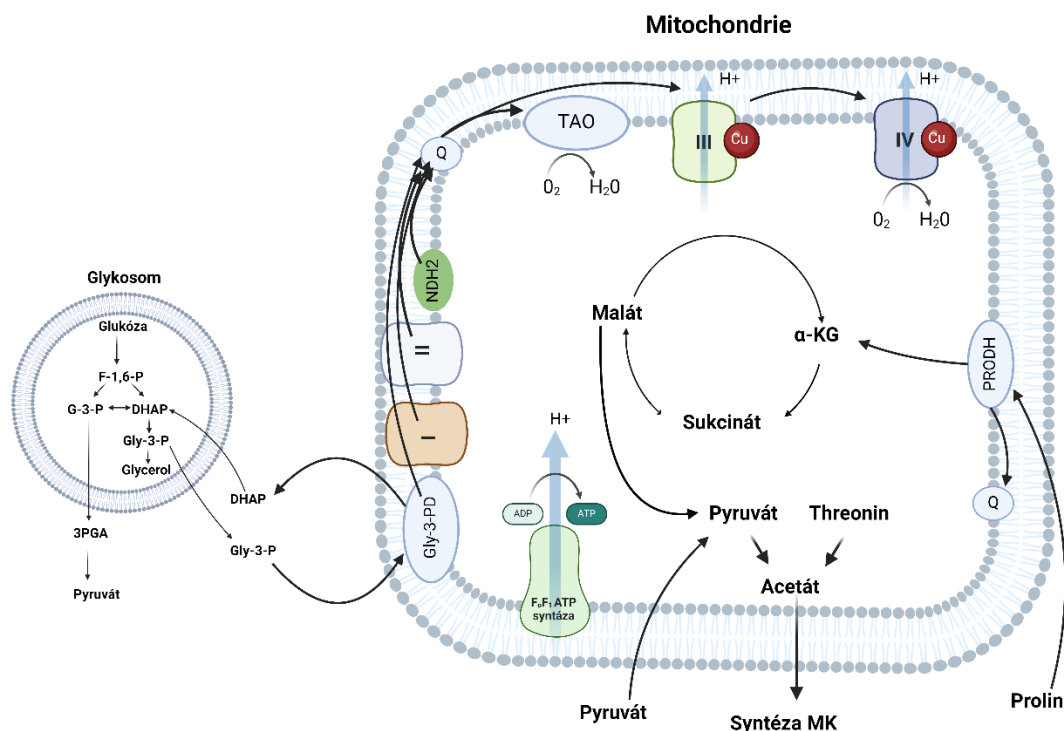
Komplex I, největší komplex dýchacího řetězce, běžně přenáší elektrony z NADH na ubiquinon (Acestor et al. 2011). Avšak absence podjednotek komplexu I nevede ke snížení dané aktivity a funkce komplexu I je tedy stále nejasná (Surve et al. 2012). Elektrony na ubiquinon přenáší alternativní NADH dehydrogenáza (NDH2), která se nepodílí na tvorbě protonového gradientu (Fang a Beattie 2002). Pouze při absenci komplexu I byl zaznamenán značný růstový pokles u NDH2 knock-down krevních forem (Surve et al. 2017). Tento výsledek naznačuje, že NDH2 a komplex I jsou schopné se vzájemně zastoupit. NDH2 pravděpodobně hraje klíčovou roli v udržování redoxní rovnováhy  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  v mitochondrii (Surve et al. 2017).

Ubichinon přijaté elektrony dále přenáší na trypanosomovou alternativní oxidázu (TAO), která se vyskytuje ve vnitřní membráně mitochondrie. TAO poté přenáší elektrony na kyslík za vzniku vody. Během přenosu elektronů nedochází k transportu protonů do mezimembránového prostoru mitochondrie (Chaudhuri et al. 2006). Jelikož je TAO úzce spjata s NDH2, narušení TAO aktivity vede ke snížené aktivitě glykolýzy. Místo dvou molekul ATP se generuje z jedné molekuly glukózy pouze jedna molekula ATP, což výrazně ovlivňuje růst parazita (Helfert et al. 2001).

Protonový gradient je důležitý pro transport iontů, metabolitů a jaderně-kódovaných proteinů skrze vnitřní membránu mitochondrie. Z tohoto důvodu u krevní formy  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP syntáza funguje v opačném směru, generuje protonový gradient za hydrolýzy ATP (Nolan a Voorheis 1992). Tyto odlišnosti vedou k výrazné redukci mitochondrie u krevní formy ve srovnání s hmyzí formou. Mitochondrie jsou menší a tvoří méně krist (Bílý et al. 2021).

### **Hmyzí forma *Trypanosoma brucei***

V přenašeči využívá *T. brucei* jako hlavní energetický zdroj prolin (**Obr. 8**). Prolin přijímá pomocí specifických přenašečů vyskytujících se v CM (Haindrich et al. 2021).



Obrázek 8. Zjednodušené znázornění vybraných drah energetického metabolismu hmyzí procyklické hmyzí formy *T. brucei*. Je zde uvedena glykolytická dráha, která probíhá z velké části v glykosomech *T. brucei*. Dále je součástí této dráhy důležitý glycerol-3-fosfátový článek, propojující glykosom a mitochondrii, který přenáší elektrony pomocí glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (Gly-3-PD) na ubichinon (Q), a dále glycerol-3-fosfátový článek reoxiduje NADH v glykosomu. Hlavním substrátem pro energetický metabolismus je prolin, který je v mitochondrii zpracován na alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG), jenž vstupuje do Krebsova cyklu. Na zpracování prolinu v metabolismu se podílí prolin dehydrogenáza (PRODH), která přenáší elektrony na ubichinon. Krebsův cyklus je plně funkční, leč většinou není dokončen. Veškerý acetyl-CoA je přeměněn na acetát, Krebsův cyklus začíná nejčastěji od  $\alpha$ -KG, kdy dochází k jeho přeměně  $\alpha$ -KG až na sukcinát. Během této konverze je syntetizováno ATP. Sukcinát může být vyloučen ven z buňky nebo je dále oxidován na fumarát, přičemž elektrony jsou přeneseny na komplex 2. Poté je fumarát zpracován až na malát. Dále je z pyruvátu a threoninu tvořen acetát, který je důležitým prekurzorem pro syntézu mastných kyselin. V mitochondrii se též vyskytuje plně funkční elektronový transportní řetězec. Elektrony jsou přeneseny na ubichinon kromě glycerolového článku a PRODH pomocí alternativní dehydrogenázy (NDH2), komplexu II a nejspíš komplexu I. Ubichinon pak přenáší elektrony zejména na komplex III, ale též část elektronů přenáší na TAO. Komplex IV a TAO redukuje kyslík na vodu.  $F_0F_1$  ATP syntáza pomocí protonového gradientu generuje ATP. Zkratky použité v obrázku: F-1,6-P (fruktóza-1,6-bisfosfát); G-3-P (glyceraldehyd-3-fosfát); DHAP (dihydroxyacetonfosfát); 3PGA (3-fosfoglycerát); G-3-PD (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza); NDH2 (alternativní dehydrogenáza); Q (ubichinon); TAO (trypanosomální alternativní oxidáza); PRODH (prolin dehydrogenáza);  $\alpha$ -KG ( $\alpha$ -ketoglutarát); MK (mastné kyseliny). Upraveno podle Zíková (2022) a vytvořeno v BioRender.com.

Prolin je nejdříve oxidován v mitochondrii na glutamát ve dvou krocích pomocí FAD-dependentní prolin dehydrogenázy (PRODH), a pyrrolin-5 karboxylát dehydrogenázy (P5CDH). Tyto dehydrogenázy jsou velmi důležité i pro udržování protonového gradientu a produkci ATP, jelikož během oxidace prolinu předávají elektrony na elektronový transportní řetězec (Paes et al. 2013). Oxidace prolinu je zcela zásadní pro hmyzí formu *T. brucei*, jelikož hmyzí formy se sníženou expresí P5CDH nebyly schopny kolonizovat střední střevo

mouchy Tse-tse (Mantilla et al. 2017). Glutamát je následně přeměněn na alfa-ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) glutamát dehydrogenázou nebo alanin transaminázou.

V Krebsově cyklu většinou nedochází k přeměně acetyl-CoA až na  $\text{CO}_2$ . Místo toho je veškerý acetyl-CoA přeměněn na acetát, který je jinak zejména tvořen skrze threonin (Millerioux et al. 2013). Stejně jako u krevní formy acetát putuje do cytosolu, kde je přeměněn zpátky na acetyl-CoA, který slouží k syntéze mastných kyselin (Rivière et al. 2009). Hlavním substrátem pro Krebsův cyklus je  $\alpha$ -KG. V Krebsově cyklu dochází k přeměně  $\alpha$ -KG až na sukcinát. Během této konverze dochází k získání ATP (Bochud-Allemann a Schneider 2002). Sukcinát je vyloučen ven z buňky nebo je dále oxidován na fumarát, přičemž elektrony jsou přeneseny na komplex II. Dále je fumarát zpracováván až na malát (Zíková 2022).

Narozdíl od krevní formy je zde výrazně vyšší exprese proteinů komplexů II, III a IV, které jsou využity v rámci elektronového transportního řetězce (Zíková et al. 2017). Celkem 5 enzymů se podílí na transportu elektronů na ubiquinon. Jedná se o komplex 1, NDH2, glycerol-3-fosfátový člunek, komplex 2 a PRODH (Acestor et al. 2011). Také u hmyzí formy je funkce komplexu 1 nejasná. Při narušení tvorby komplexu 1 prostřednictvím RNA interference nedochází k výraznému ovlivnění jeho aktivity, ani nedochází ke změně mitochondriálního membránového potenciálu (Verner et al. 2011). Nicméně důležitost komplexu 1 by mohla být při přeměně epimastigotního stádia na metacyklické stádium, stádium infekční pro savčího hostitele. *In vitro* byla u epimastigotů zjištěna zvýšená potřeba NADH a vyšší membránový potenciál. Tato změna nejspíš reaguje na absenci komplexů III a IV u metacyklických trypanomastigotů zvýšenou aktivitou komplexu I. Další možnou funkcí komplexu I by mohlo být generování ROS, které jsou důležité pro přeměnu epimastigotů. Avšak zatím není určena přesná funkce (Doleželová et al. 2020). NDH2 je důležitým přenašečem elektronů na ubiquinon, tudíž se nepřímou podílí na syntéze ATP. Zároveň udržuje redoxní rovnováhu  $\text{NAD}^+$  v cytosolu na základě získaných dat u hmyzí formy (Verner et al. 2013). Glycerol-3-fosfátový člunek má stejnou funkci jako u krevních forem, avšak není tak esenciální z důvodu celkově nižší glykolytické aktivity (Zíková 2022). Komplex II se podílí na metabolismu prolinu, jelikož přijímá elektrony od sukcinátu z Krebsova cyklu a přenáší je na ubiquinon (Coustou et al. 2008). Důležitost komplexu II u hmyzí formy je vyjádřena zvýšenou aktivitou komplexu během jejího vývoje (Doleželová et al. 2020). K oxidaci redukováného ubiquinonu dochází buď tradičně přes komplexy III a IV nebo pomocí TAO. Tento fenomén umožňuje *T. brucei* adaptaci na změnu prostředí. Komplex III je náchylný na tvorbu ROS, a proto by v případě jejich zvýšené koncentrace mohla být využita oxidace skrze TAO (Zíková 2022). Jak již bylo zmíněno výše, k redukci komplexů III a IV dochází při přeměně epimastigotních stádií na metacyklické trypanomastigoty, jelikož se parazit adaptuje na prostředí v savčím hostiteli (Doleželová et al. 2020). Vlivem snížené aktivity komplexů III a IV dochází k snížení produkce ATP, což vede ke zvýšené aktivitě AMP-indukované protein kinázy. Ta snižuje aktivitu drah spotřebujících ATP, což vede ke vzniku méně pohyblivých metacyklických trypanomastigotů (Herzig a Shaw 2018; Toh et al. 2021). TAO využívá hmyzí procyklická



forma přibližně z 20 % (Gnipová et al. 2012) oproti epimastigotům kteří ji využívají z přibližně 80 % z důvodu snížené aktivity komplexů III a IV (Doleželová et al. 2020). Činností cytochromových komplexů obsahujících měď je generována protonmotivní síla k syntéze ATP pomocí  $F_0F_1$  ATP syntázy (Ziková et al. 2009).

### 3 Cíle práce

- 1) Určit funkci TbATPázy u *T. brucei*.
- 2) Studovat fenotyp *T. brucei* po snížení exprese TbATPázy.
- 3) Stanovit lokalizaci TbATPázy u *T. brucei*.
- 4) Stanovit míru exprese TbATPázy v různých podmínkách.
- 5) Popsat koncentraci mědi v buňkách *T. brucei*
- 6) Stanovit míru toxicity mědi u *T. brucei*.

## 4 Materiál a metody:

### 4.1 Kultivace buněk *Trypanosoma brucei*

V diplomové práci se pracovalo s procyklickým kmenem 29-13. Tento kmen obsahuje T7 RNA polymerázu s neomycinovou rezistencí a tetracyklinový represor s hygromycinovou rezistencí. Dále se využíval s krevní kmen New York Single Marker (BSF SM), který obsahuje též T7 RNA polymerázu a tetracyklinový represor s neomycinovou rezistencí.

#### 4.1.1. Rozmražení a kultivace kultury

1 ml zamražených buněk *T. brucei* byl přenesen do 5 ml média HMI-9 (Tab. 1) v případě krevních forem (Hirumi a Hirumi 1989) nebo do 5 ml média SDM-79 (Tab. 2) v případě hmyzích forem (Brun a Schönenberger 1979). Buňky byly stočeny (1300 g, 4 °C, 5 min) a resuspendovány v čerstvém médiu v objemu 5 ml. Buňky byly kultivovány v 25 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích s filtrem. Krevní formy byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>, hmyzí formy v termostatu při teplotě 27 °C.

Tabulka 1. Složení HMI-9 média v objemu 1 l

Složka	Objem/hmotnost
Iscove's (Gibco)	17,66 g
NaHCO <sub>3</sub> (Penta)	3,02 g
Pyruvát (Sigma-Aldrich)	110 mg
PenStrep 100× (Gibco)	1 ml
Tymidin (Sigma-Aldrich)	39 mg
2-merkptoethanol (Sigma)	14,2 µl
Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich)	100 ml
5 mM Bathocuproin (Merck)	10 ml
0,1 M Hypoxanthin (Sigma-Aldrich)	10 ml
0,15 mM L-cystein (Sigma-Aldrich)	10 ml
Voda	do 1 l

Tabulka 2. Složení SDM-79 média v objemu 1 l

Složka	Objem/hmotnost
SDM79 CGGGPPTA powder (GE Healthcare)	22,05 g
NaHCO <sub>3</sub> (Penta)	2 g
Acetát sodný (Sigma)	10 mg
Glutamová kyselina (Sigma)	22 mg
Glutamin (Sigma)	500 mg
Prolin (Sigma)	600 mg
Threonin (Sigma)	400 mg
Pyruvát sodný (Sigma)	100 mg
Glukóza (Sigma)	0,5 g
Hemin (Sigma)	0,5 ml
PenStrep 100x (Gibco)	10 ml
Voda	do 900 ml
Fetální bovinní sérum (Sigma)	100 ml

Kultura WT krevních forem byla naředěna po 48 h na koncentraci  $1,5 \times 10^4$  buněk/ml do 5 ml HMI-9 s neomycinem (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ), aby byla maximální koncentrace buněk  $3 \times 10^6$ /ml v HMI-9. Kultura WT hmyzí formy byla naředěna po 48 h na koncentraci  $1,5 \times 10^5$  buněk/ml do 5 ml SDM-79 s neomycinem (15  $\mu\text{g/ml}$ ) a hygromycinem (50  $\mu\text{g/ml}$ ), aby byla maximální koncentrace buněk  $3 \times 10^7$ /ml v SDM-79. Další přidaná antibiotika pro transformované buňky jsou zobrazena v Tab. 3.

Tabulka 3. Seznam buněčných linií s přidanými antibiotiky v důsledku genetické manipulace

Buněčná linie(forma)	Antibiotikum	Koncentrace
Neindukovaný Knock-down (krevní a hmyzí forma)	Phleomycin	2,5 $\mu\text{g/ml}$
Transformanty s V5 značkou (hmyzí forma)	Puromycin	1 $\mu\text{g/ml}$

#### 4.1.2. Zamražení kultur

Část buněk byla uchována v tekutém dusíku pro pozdější použití během experimentů. Nejdříve bylo do zkumavky přidáno 800  $\mu\text{l}$  narostlé kultury, ke které bylo následně přidáno 200  $\mu\text{l}$  50% glycerolu. Buňky byly nejprve uloženy do zamrazovacího kontejneru, kde byla snižována teplota 1  $^{\circ}\text{C}/1$  min až na konečnou teplotu  $-80$   $^{\circ}\text{C}$  v mrazáku a poté byly buňky přeneseny do tekutého dusíku ( $-196$   $^{\circ}\text{C}$ ).

## 4.2 Příprava polyklonální protilátky proti TbATPáze

### 4.2.1 Primery a plazmidy

Pro amplifikaci celé *tbatpázy* byly využity primery (Tab. 4), pro amplifikaci zkrácené verze *tbatpázy* byly navrženy primery (Tab. 5). Primery byly navrženy v programu Geneious (<https://www.geneious.com/>). Pro zaklonování genu do kompetentního kmene *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific, US) byl využit plazmid pJET1.2/blunt Cloning Vector (Thermo Fisher Scientific) s ampicilinovou rezistencí. Pro expresi proteinu byl použit finální plazmid pET42b (Novagen, US) s kanamycinovou rezistencí. pET42b obsahuje histidinovou značku, díky které je možné izolovat protein za denaturačních podmínek.

Tabulka 4. Primery využívané pro amplifikaci *tbatpázy*

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Forward	5'-ACACATATGGAGGAGAACAACGCAACTACAG-3'	<u>NdeI</u>
Reverse	5'-ACAGGATCCAATGATATCAATGAACTGTTCCCGT-3'	<u>BamHI</u>

Tabulka 5. Primery využívané pro amplifikaci fragmentu *tbatpázy* (1792-2514)

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Forward	5'-CACCATATGATGGTGGGAAGCTGGTGTGG-3'	NdeI
Reverse	5'-CACGGATCCGCCCAACAACACATCCC-3'	BamHI

#### 4.2.2 Izolace genomové DNA

Genomová DNA z procyklické formy *Trypanosoma brucei* kmenu 29-13 byla izolována podle DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, DE). Tato DNA sloužila jako výchozí templát pro PCR.

#### 4.2.3 PCR

Specifické úseky DNA byly amplifikovány pomocí PCR reakce (Tab. 6 a 7), která byla provedena dle protokolu výrobce (Takara, JP).

Tabulka 6. Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství
PrimeStar Max DNA polymeráza (Takara)	12,5 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Genomová DNA	0,5 µl
Deionizovaná voda	10 µl

Tabulka 7. Průběh PCR reakce v termocykléru s polymerázou PrimeStar Max DNA

Počet cyklů	Teplota	Čas
1x	98 °C	10 min
	98 °C	10 sek
35x	55 °C	5 sek
	72 °C	30 sek
1x	72 °C	1 min
1x	4 °C	∞

#### 4.2.4 Izolace DNA fragmentů

Vzorky z PCR byly vloženy do 1 % agarózového gelu s 0,05 % interkalačním barvivem SYBR Safe (Invitrogen). PCR vzorky vytvořené pomocí PrimeStar Max DNA polymerázy byly obarveny 6x ředěným barvivem Trirack (Thermo Fisher Scientific). Následně byla spuštěna horizontální elektroforéza po dobu 30 min při 100 V. Pomocí vydezinfikovaného skalpelu byl vyříznuta z gelu DNA o požadované velikosti. Pro izolaci DNA z gelu byla využita komerčně dostupná sada E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, US), postupovalo se dle manuálu výrobce.

#### 4.2.5 Ligace do primárního plazmidu

Inzert byl vložen do pJET1.2/blunt Cloning Vector prostřednictvím sady CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Fisher Scientific) pomocí ligační reakce (Tab. 8). Negativní kontrolou byla ligační reakce, ve které byl inzert nahrazen vodou. Ligační reakce probíhala po dobu 5 min při 22 °C.

Tabulka č. 8 Směs ligační reakce do pJET1.2/blunt Cloning Vector

Složka	Množství
Inzert	150 ng
pJET1.2/blunt	50 ng
T4 Ligase	1 µl
10X T4 DNA Ligase Buffer	1 µl
Voda	do 10 µl

#### 4.2.6 Transformace do bakterií

Plazmid pJET1.2/blunt Cloning Vector s inkorporovanou DNA byl vložen do kompetentních bakterií *E. coli* kmene TOP10, dále TOP 10. Bakterie na ledě byly inkubovány s ligační směsí po dobu 30 min. Následně došlo k teplotnímu šoku po dobu 30 vteřin při teplotě 42 °C ve vodní lázni. Bakterie byly poté přeneseny na 2 min do ledu. Po přidání 250 µl předeřhátého SOC média (Tab. 9), byly bakterie třepány (200 RPM, 37 °C, 1 h). Dále byl k bakteriím přidán ampicilin. Poté byly přeneseny na agarové plotny s LB médiem (Tab. 10) a inkubovány (37 °C, 16 h).

Tabulka 9. Složení SOC (super optimal broth) média v objemu 1 l při pH 7

Složka	Množství/objem
Trypton (Oxoid)	20 g
Kvasinkový extrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Sigma)	0,5g
250 mM KCl (Sigma)	10 ml
Přilít dH <sub>2</sub> O do celkového objemu 1 l, přizpůsobit pH na 7 a poté autoklávovat	
20 % Glukóza (Sigma)	20 ml
2M MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	5 ml

Tabulka 10. Složení LB (Luria-Bertani) média v objemu 1 l při pH 7

Složka	Množství/objem
Trypton (Oxoid)	10 g
Kvasinkový extrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Sigma)	10 g
Voda	doplnit do 1 l

#### 4.2.7 Izolace transformovaného plazmidu

Kolonie bakterií byly odebrány do předem připravených zkumavek s 5 ml LB média a s ampicilinem v koncentraci 0,1 mg/ml. Zkumavky byly třepány (220 RPM, 37 °C, 16 h). Z narostlých bakterií byla izolována plazmidová DNA pomocí sady

E.Z.N.A.® Plasmid Mini kit I (Omega Bio-Tek). Kvalita výsledného produktu byla ověřena pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Plazmidová DNA byla osekvenována (Tab. 11) v sekvenační laboratoři (laboratoř sekvenace Biocev, RNDr. Štěpánka Hrdá, Ph.D.)

*Tabulka 11. Sekvenační reakce*

Složka	Množství
Plazmidová DNA	3 ng/100 párů bází
Primer forward	0,5 µl
Primer reverse	0,5 µl
Voda	Do 8 µl

#### 4.2.8 Vložení inzertu do pET42b

Restrikční reakce byla provedena pro plazmid pJET1.2/blunt s inzertem a finální expresní plazmid pET42b (37 °C, 1 h) podle protokolu výrobce (Thermo Fisher Scientific) (Tab. 12 a 13). Pro restrikční reakce byly použity restrikční enzymy z komerčně dostupné sady FastDigest restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific) (Tab. 4 a 5).

*Tabulka 12. Restrikční reakce pro pJET1.2/blunt s inzertem*

Složka	Množství
NdeI	1 µl
BamHI	1 µl
10x Fast Digest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific)	1 µl
pJET1.2/blunt s inzertem	1 µg
Voda	do 10 µl

*Tabulka 13. Restrikční reakce pro pET42b*

Složka	Množství
NdeI	3 µl
BamHI	3 µl
10x Fast Digest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific)	3 µl
pET42b	3 µg
Voda	do 60 µl

Vzorky DNA byly rozděleny podle velikosti pomocí horizontální elektroforézy. DNA byla opět izolována pomocí sady E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek), postupováno bylo dle protokolu výrobce.

Integrace vyštěpeného inzertu z pJET1.2/blunt do expresního plazmidu pET42b byla provedena dle ligační reakce (Tab. 14). Množství inzertu vůči plazmidu odpovídalo poměru 3:1 (Kap. 4.2.5) a poté následovala transformace bakterií (Kap. 4.2.6).

Tabulka 14. Ligační reakce inzertu do plazmidu pET42b

Složka	Množství
Inzert	Dle koncentrace
pET42b	50 ng
T4 Ligase (Thermo Fisher Scientific)	1 $\mu$ l
10X T4 DNA Ligase Buffer	1 $\mu$ l
Voda	do 10 $\mu$ l

Transformované TOP10 bakterie byly přeneseny na plotny s kanamycinem ve finální koncentraci 50  $\mu$ g/ml a bez kanamycinu a inkubovány (37 °C, 16 h). Jako negativní kontrola byly použity netransformované bakterie, které byly přeneseny na plotny při stejných podmínkách. Na závěr byla izolována a osekvenována plazmidová DNA z transformovaných bakterií TOP10 (Kap. 4.2.7). Výsledkem bylo úspěšné zaklonování inzertu s expresním plazmidem pET42b do TOP10 bakterií.

#### 4.2.9 Ověření exprese pomocí indukce IPTG

S cílem vytvořit polyklonální protilátky vůči *tbatpáze*, byl plazmid pET42b s inzertem transformován do bakterií *E. coli* linie BL21, použitím totožného postupu jako při transformaci do bakterií TOP10. Bakterie BL21 úspěšně narostly na plotnách v LB médiu s kanamycinem (výše uvedená koncentrace). BL21 obsahují T7 RNA polymerázu, která rozpoznává T7 promotor na pET42b plazmidu. Tato RNA polymeráza transkribuje úsek v plazmidu 8x rychleji oproti RNA polymeráze z *E. coli*, a proto se využívá k expresi cíleného genu.

Alespoň 3 kolonie bakterií BL21 byly inkubovány (Kap. 4.2.8). U každé kolonie BL21 bakterií byl postup následující. Po inkubaci bylo odebráno z narostlé kultury bakterií 300  $\mu$ l do 30 ml LB média. Zředěná kultura byla třepána (Kap. 4.2.8). Buňky byly třepány, dokud nebyla změřena hodnota optické denzity (OD) při vlnové délce 600 nm 0,2 na přístroji WPA CO800 Biowave Cell Density Meter (Biochrom, GB).

Poté byl odebrán 1 ml buněk, který byl stočen (16 000 g, 25 °C, 1 min). Získaný pelet byl zavařen v 50  $\mu$ l vzorkovém pufru (Tab. 16) (100 °C, 10 min). Tento vzorek sloužil jako kontrola. Zbylá kultura byla přenesena do nové zkumavky a inkubována (IPTG (Sigma, US) ve výsledné koncentraci 0,5 mM, 37 °C, 3 h). Každou h byl odebrán vzorek, který byl stočen a zavařen za stejných podmínek jako kontrolní vzorek. Objem odebraných vzorků byl



s každou h inkubace snižován o 100  $\mu$ l, aby byla vytvořena podobná koncentrace buněk mezi vzorky. Po zavaření byly všechny vzorky stočeny (21 000 g, 25  $^{\circ}$ C, 1 min).

Tabulka 16. Složení vzorkového pufru

Složka	Objem
Roztok A: 3 g Trisma base (Sigma) v 50 ml vody, pH 6,8	2,4 ml
10% SDS (Sigma)	2 ml
Glycerol	1 ml
Voda	4 ml
0,1% bromfenolová modř v 1 ml roztoku A	0,1 ml
2-merkptoethanol (Sigma)	0,5 ml

Míra proteinové exprese byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy při 150 V po dobu 1 h a 15 min. Na polyakrylamidový gel byly naneseny vzorky zavařené ve vzorkovém pufru. Velikost proteinů byla porovnána pomocí PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Pro určení množství proteinů byl obarven 12 % polyakrylamidový gel s proteiny pomocí Coomassie Brilliant Blue (Sigma) po dobu 16 h. Gel byl poté odbarven odbarvovacím roztokem (Tab. 17) pravidelně po 20 min, dokud nebyly vidět jednotlivé proteiny.

Tabulka 17. Složení odbarvovacího roztoku v objemu 1 l

Složka	Objem
70% Ethanol (Lach-Ner)	250 ml
CH <sub>3</sub> COOH	100 ml
Voda	650 ml

Ověření exprese TbATPázy bylo vizualizováno pomocí metody western blot, v tomto případě byla použita myší protilátka proti histidinové značce v poměru 1:1000 (Kap. 4.2.12). Bakterie BL21 neexprimovaly TbATPázu. U těchto bakterií byla upravena doba a teplota indukce exprese pomocí IPTG. Vzorky byly inkubovány (27  $^{\circ}$ C, 16 h místo 37  $^{\circ}$ C, 3 h). TbATPáza obsahuje 8 transmembránových domén. Kvůli nim nemusí být exprimována v bakteriích. Z tohoto důvodu byla do bakterií BL21 vložena zkrácená, cytosolická část. Primery použité pro klonování zkrácené části *tbatpázy* jsou uvedeny v tabulce 5. Ověření exprese probíhalo pomocí IPTG (sigma) při stejné koncentraci (0,5 mM) v obou variantách (3 h při 37  $^{\circ}$ C a 16 h při 27  $^{\circ}$ C), nicméně k expresi proteinu nedošlo. Proto byla vložena

zkrácená verze proteinu do modifikovaných kmenů *E. coli* Rosetta (DE3) Competent Cells (Novagen) a Rosetta 2(DE3) Competent Cells (Novagen) postupem shodným jako u TOP10, přičemž transformované bakterie byly nasazeny na plotny s kanamycinem a chloramfenyklem (96 µg/ml). Tyto kmeny *E. coli* obsahují širší paletu kodonů, které využívá *E. coli* při translaci, díky tomu je u nich zvýšena pravděpodobnost exprese proteinu.

U bakterií Rosetta 2(DE3) Competent Cells (Novagen) byla ověřena exprese zkrácené části proteinu při indukci IPTG ve finální koncentraci 0,5 mM po dobu 16 h při 27 °C.

Tyto bakterie byly indukovány IPTG za stejných podmínek v 2 litrech pro získání dostatečného množství pro izolaci proteinu za denaturačních podmínek. Nejdříve byly nasezeny bakterie do 50 ml LB média s příslušnými antibiotiky po dobu 16 h do 250 ml Erlenmeyerovy baňky a třepány (220 RPM, 37 °C, 16 h). Téhož dne byly připraveny 2 l LB média (37 °C). Po 16 h bylo vloženo 20 ml narostlých bakterií do 2 litrů přehřátého LB média a třepány (200 RPM, 37 °C). Třepání bakterií skončilo v momentě, kdy byla naměřena hodnota OD<sub>600</sub> mezi 0,6-0,8. Poté byl odebrán 1 ml buněk jako kontrola a zbytek kultury byla přenesen na led. Následně byla kultura inkubována při stejných podmínkách jako za menšího objemu (0,5 mM IPTG, 27 °C, 16 h). Po inkubaci bylo z kultury odebráno 500 µl vzorku pro ověření exprese proteinu. Následně byl zbytek kultury stočen (6 000 g, 4 °C, 15 min). Výsledný pelet byl promyt fosfátovým pufrům (PBS) za stejných podmínek. Pelet byl skladován při -20 °C.

#### 4.2.10 Izolace proteinu za denaturačních podmínek

Pelet s buňkami, u něhož byla indukována exprese pomocí IPTG, byl resuspendován v 20 ml B pufru. Poté byla narušena membrána bakterií pomocí sonikace (QSonica Q125, US) po dobu 2 min v intervalu 1s/1s s amplitudou 60 %. Zlyzované buňky byly stočeny v ultracentrifugačních zkumavkách (100 000 g, 4 °C, 15 min). Supernatant byl odebrán do 50 ml zkumavky. Poté byl menší objem supernatantu a peletu zavařen ve vzorkovém pufru (100 °C, 10 min). Do supernatantu bylo přidáno po 1 ml HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma). Jedná se o roztok obsahující agarózové kuličky s niklem, které se váží na proteiny obsahující histidinovou značku. Vzniklá směs byla inkubována 1 h při pokojové teplotě za mírného míchání. Poté byla směs přenesena na kolonu Poly-Prep Chromatography Column (Bio-Rad, US). Supernatant, který protekl kolonou, flowthrough, byl vloženo do 50 ml zkumavky.

Kolona byla dále promývána v tomto pořadí:

2xC 5 ml – frakce přenesena do zkumavky

4xD 0.5 ml – frakce přenesena do zkumavky

4xE 0.5 ml – frakce přenesena do zkumavky

4xI 0.5 ml – frakce přenesena do zkumavky

Pufry (Tab. 18) se liší ve svém pH, díky kterému se postupně pročišťuje matrice s navázaným proteinem. V posledním kroku eluce byly odebrány agarózové kuličky.

Tabulka 18. Složení pufrů při izolaci proteinu za denaturačních podmínek

Pufr B

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8M
pH 8	

Pufr C

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8M
pH 6,3	

Pufr D

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8M
pH 5,9	

Pufr E

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8M
pH 4,5	

Pufr I

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	50 mM
NaCl (Sigma)	300 mM
Imidazol (Sigma)	400 mM
pH 8	

Ze všech získaných frakcí byl odebrán menší objem, který byl zavařen ve vzorkovém pufru (100 °C, 5 min). Všechny vzorky byly skladovány při –20 °C. Vzorky byly naneseny na 12 % polyakrylamidový gel a pomocí SDS-PAGE elektroforézy byly rozděleny podle velikosti. Gel byl obarven v Coomassie Brilliant Blue, čímž byla ověřena úspěšnost izolace a množství proteinu v jednotlivých frakcích. Přibližná koncentrace proteinu ve vzorku byla stanovena podle gelu odbarveného od Coomassie Brilliant blue. Na závěr byla detekována přítomnost proteinu pomocí metody western blot, kdy byla nejdříve inkubace v myší primární protilátce proti histidinové značce v poměru 1:1000 a poté v sekundární anti-myší protilátce s křenovou peroxidázou v poměru 1:5000 (Kap. 4.2.12.).

Frakce E1 a E2 byly sloučeny dohromady. Separace proteinů proběhla na velké SDS-PAGE elektroforéze při 300 V po dobu 4 h. Gel byl obarven v Coomassie Brilliant Blue a následně odbarven odbarvovacím roztokem. Poté byl vyříznut protein o požadované velikosti. Protein byl promýván 2x15 min ledovým a sterilním fosfátovým pufrům (PBS) ve zkumavce. Gel byl homogenizován pomocí Douncova homogenizátoru (Kimble-chase, US) na drť. Výsledný homogenizovaný produkt byl připraven pro injekci do potkana. Ve výsledku byly připraveny 4 injekční dávky o 230 µg proteinu do potkana. Zkumavky byly poté předány RNDr. Janu Machovi, Ph.D. Ten injikoval do potkana jednu dávku po 28 dnech a po poslední dávce potkana vykrvíl. Získaná krev byla nechána stát po dobu 15 min za pokojové teploty, aby došlo ke srážení. Poté byla stočena (2000 g, dobu 10 min) a následně bylo odebráno sérum (supernatant). Do séra byl přidán azid sodný ve finální koncentraci 0,03 %, aby nedošlo k možné kontaminaci. Sérum obsahuje polyklonální protilátky proti TbATPáze.

#### 4.2.11 Příprava vzorků pro testování protilátky

Protilátka byla testována na lyzátech, membránové a cytosolické frakci WT obou forem *Trypanosoma brucei*. Od každé formy bylo sklizeno  $1,5 \times 10^7$  buněk. U každé formy se pokračovalo následovně. Buňky byly stočeny (1300 g, 4 °C, 5 min) a byly naředěny do 240 µl příslušného média. 40 µl vzorku bylo vloženo do nové zkumavky a zavařeno ve vzorkovém pufru. Zbýlých 200 µl buněk bylo sonikováno po dobu 10 sekund v intervalu 1s/1s s amplitudou 60 %. Lyzát byl stočen za stejných podmínek. Pelet obsahuje nezlyzované buňky. Supernatant obsahuje membránovou a cytosolickou složku. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky a stočen (21 000 g, 4 °C, 10 min). Výsledný pelet tvoří membránová frakce a supernatant cytosolická frakce. Pelet a supernatant byly zavařeny ve vzorkovém pufru.

Dále byla polyklonální protilátka testována u knock-down indukovaných a neindukovaných buněk (knock-down dále označen jako „kmen  $\Delta$ tbatpáza“) krevní a hmyzí formy *T. brucei* pomocí metody western blot. V tomto případě byly buňky neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza rozděleny do dvou zkumavek, přičemž jedna zkumavka byla indukována tetracyklinem (1µg/ml) po dobu 3 dnů a druhá zkumavka neobsahovala tetracyklin. Poté byly buňky kultivovány po dobu 48 h (Kap. 4.1).  $1,5 \times 10^7$  buněk neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza a kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou bylo stočeno (1300 g, 4 °C, 5 min) a naředěno do 240 µl média a poté zavařeny ve vzorkovém pufru (100 °C, 10 min).

Na závěr byla použita jako pozitivní kontrola frakce E1 naředěná ve vzorkovém pufru a zavařená za stejných podmínek. Veškerá příprava vzorků probíhala při 4 °C. Vzorky byly skladovány při – 20 °C.

#### 4.2.12 Testování protilátky pomocí metody western blot

Zavařené vzorky z předchozí kapitoly byly naneseny na 10 % polyakrylamidový gel. Proteiny byly rozděleny podle velikosti pomocí SDS-PAGE (Kap. 4.2.9). Poté byly proteiny z gelu přebíleny na nitrocelulózovou membránu při 70 mA po dobu 1 hod a 25 min. Membrána byla obarvena roztokem Ponceaus S (Sigma) pro ověření rovnoměrného přenesení proteinů na membránu. Ponceaus S byl následně odmýván destilovanou vodou a membrána

s vizualizovanými proteiny byla oskenována. Poté byla membrána zalita roztokem sušeného mléka po dobu alespoň 1 h při 4 °C. Tím došlo k jejímu zablokování.

Membrána byla poté vložena do fólie a zalita v 2 ml roztoku sušeného mléka s naředěnou polyklonální protilátkou z potkana proti TbATPáze v poměru 1:100. Fólie byla poté zalaminována pomocí svářečky. Inkubace v primární protilátce probíhala alespoň 1 h za mírného třepání při 4 °C. Primární protilátka byla odmyvána 3x20 min roztokem sušeného mléka. Membrána byla poté inkubována 1 h v zředěné sekundární anti-potkaní protilátce s křenovou peroxidázou v roztoku sušeného mléka v poměru 1:5000. Sekundární protilátka byla poté odmyvána roztokem sušeného mléka 2x20 min a fosfátovým pufrům 2x20 min. Membrána byla poté vložena do nové fólie a zalita 1 ml Immobilon Forte Western HRP substrate (Merck, DE). Poté byla vložena do přístroje Amersham Imager 600 (GE Life Sciences, US), kde byly chemiluminiscenčně vyvolány proteiny na membráně.

#### 4.2.13 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii

Dále byla testována polyklonální protilátka pomocí fluorescenční mikroskopie u hmyzí formy *T. brucei* se zvýšenou TbATPázou. Následující protokol platí pro přípravu jednoho preparátu. 0,5 ml buněk o koncentraci  $7,5 \times 10^6$  buněk/ml byl přenesen na podložní sklo a inkubován (27 °C, 10 min). Následné zpracování vzorku odpovídá kapitole 4.4.2 Jako negativní kontrola byly použity buňky *T. brucei*, které nebyly inkubovány s polyklonální protilátkou proti TbATPáze. Dále byly připraveny preparáty s inkubovanou protilátkou ve zředěné formě 1:200 a 1:2000. Sekundární protilátka byla použita anti-potkaní Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Následně byly preparáty podrobeny fluorescenční mikroskopii viz (Kap. 4.4.3).

### 4.3 Snížení exprese pomocí metody RNAi

#### 4.3.1 RNA interference

Během RNAi dochází k tvorbě dvouvláknových short interfering RNA, které rozpoznává protein DICER. Ten štěpí ds siRNA na kratší úseky, které na sebe váže protein Argonaut. Argonaut jedno z vláken degraduje a poté s dalšími proteiny tvoří komplex zvaný RISC (RNA induced silencing complex). Vlákno RNA se komplementárně váže na cílenou mRNA. Dvouvláknovou mRNA RISC rozstříhne, čímž dochází k zastavení translace. Dochází tak k regulaci genové exprese.

V rámci RNAi byla do *T. brucei* vložena část *tbatpázy* v plazmidu p2T7-177, obsahující T7 promotor, který je regulovaný tetracyklinem (Wickstead et al. 2002). Za přítomnosti tetracyklinu dochází k překladu inzertu z obou stran RNA polymerázou. Vznikají úseky mRNA, které jsou komplementární k úseku mRNA *tbatpázy*. Čímž dochází ke snížení exprese genu.

### 4.3.2 Primery a plazmidy

Primery (Tab.19 a 20) byly navrženy v programu Geneious. Pro zaklonování genu do bakterií TOP10 byl využit plazmid pGEM-T Easy Vector (Promega, US) s ampicilinovou rezistencí. Pro snížení exprese proteinu byl použit finální plazmid p2T7-177 s phleomycinovou rezistencí.

Tabulka 19. Primery využívané pro snížení exprese *tbatpázy* pomocí RNAi – fragment 1

Směr	Sekvence	Restrikční místo
R	5'-CACCTCGAGGCCACAAACACAACATCCC-3'	<u>XhoI</u>
F	5'-CACGGATCCTGACTTCCACGGTACACAGC-3'	<u>BamHI</u>

Tabulka 20. Primery využívané pro snížení exprese *tbatpázy* pomocí RNAi – fragment 2

Směr	Sekvence	Restrikční místo
R	5'-CACCTCGAGCGATCTCCAGAAGAGCCGAC-3'	<u>XhoI</u>
F	5'-CACGGATCCCAGTCAGTGGGAGCAGTGAG-3'	<u>BamHI</u>

### 4.3.3 PCR a ligace

Úseky DNA odpovídající fragmentům *tbatpázy* byly amplifikovány pomocí PCR z genomové DNA *T. brucei*. Reakce byla provedena dle protokolu výrobce (Takara) (Tab. 21 a 22). Zaklonování fragmentu do finálního plazmidu p2T7-177 bylo provedeno stejným postupem jako v kapitolách 4.2.4 až 4.2.8.

Tabulka 21. Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství
SapphireAmp Fast PCR Master Mix (2X Premix)	12.5 µl
10 µM Forward primer	1 µl
10 µM Reverse primer	1 µl
Templátová DNA	0.5 µl
Voda	10 µl

Tabulka 22. Průběh PCR reakce v termocykléru s polymerázou SapphireAmp Fast PCR Master mix (2x Premix)

Počet cyklů	Teplota	Čas
1x	94 °C	1 min
	98 °C	5 sec
30x	55 °C	5 sec
	72 °C	10 sec
1x	72 °C	1 min
1x	4 °C	∞

#### 4.3.4 Izolace DNA pro elektroporaci

Izolace většího množství plazmidu byla provedena pomocí sady Wizard® Plus Midipreps DNA Purification Systém (Promega). Postupovalo se obdobně jako v kapitole 4.2.7, avšak bakterie TOP 10 narostli ve větším objemu (50ml). Výsledná DNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a poté byla poslána na sekvenaci (Kap. 4.2.7).

#### 4.3.5 Linearizace a přesrážení DNA

Pro transformaci DNA do *T. brucei* byl plazmid s inzertem zlinearizován (Tab. 23), jelikož transformace s cirkulárním plazmidem nebývají úspěšné. Před linearizací plazmidu byly zkontrolovány restrikční místa v plazmidu p2T7-177. Pro restrikci finálního plazmidu byl zvolen restrikční enzym NotI. Výsledná směs byla inkubována (37 °C, 16 h).

Tabulka 23 Linearizace DNA pro jednu elektroporaci

Složka	Množství
10xFast Digest Buffer	30 µl
Plazmid s inzertem	10 µg
NotI	1 µl
Voda	Doplnit do 300 µl

Linearizovaná DNA byla izolována procesem přesrážení. Do vzorku bylo přidáno 40 µl 3M octanu sodného, pH 5,2 a 1 ml 96 % etanolu. Vzorek byl resuspendován a inkubován (- 20 °C, 15 min). Poté byl vzorek stočen (21 000 g, 4 °C, 30 min). Opatrně byl ze vzorku odsát ethanol a resuspendován v 500 µl 70 % ethanolu. Poté byl vzorek stočen za stejných podmínek a opatrně odsán etanol. Na závěr byl vzorek sušen ve zkumavce s otevřeným víčkem (40 °C, 10 min) a po vysušení bylo přidáno 50 µl vody. Během vysušení DNA zprůhlední.

Úspěšná linearizace plazmidu byla ověřena pomocí elektroforézy. Na gel byl nanesen 1 µg zlinearizovaného a cirkulárního plazmidu. Dle předpokladu měla zlinearizovaná DNA plazmidu jet pomaleji agarózovým gelem, což se potvrdilo.

#### 4.3.6 Elektroporace DNA do krevní formy *Trypanosoma brucei*

Pro jednu elektroporaci bylo přeneseno  $3 \times 10^7$  buněk do 50 ml zkumavky s označením D. Množství buněk bylo změřeno pomocí přístroje Cell Counter (Beckman Coulter, US). Poté bylo připraveno 90 ml HMI-9 média s neomycinem ve finální koncentraci 1,5 µg/ml. Přičemž byly použity tři 50 ml zkumavky. Do zkumavky s označením A bylo přidáno 30 ml a do zbylých 2 zkumavek s označením B a C bylo přidáno po 27 ml média. Zkumavka D byla stočena při (1500 RPM, 25 °C, 10 min). Výsledný pelet byl resuspendován ve 100 µl ledového TB-BSF pufru (Tab. 24). Poté bylo do kyvety vloženo 10 µg zlinearizované DNA v objemu 5 µl a následně  $3 \times 10^7$  buněk v 100 µl TB-BSF pufru. Transfekce proběhla v přístroji Amaxa

Nucleofector (Lonza, CH), program Z-001. Pro kontrolu byla provedena jedna transfekce bez přidání linearizované DNA, pro ověření že phleomycin je selekčním antibiotikem.

Tabulka 24. Složení TB-BSF pufru

Složka	Koncentrace
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	90 mM
KCl (Sigma)	5 mM
CaCl <sub>2</sub> (Sigma)	0,15 mM
HEPES (Sigma)	50 mM
pH 7,3	

Pro získání klonální populace byla směs po transfekci resuspendována ve zkumavce A. Následně byla směs ředěna desítkovou řadou, když byly 3 ml ze zkumavky A vloženy do zkumavky s označením B a ze zkumavky B byly poté vloženy 3 ml do zkumavky C. Pro každou zkumavku (A, B, C) byly připraveny 24jamkové destičky. Do každé jamky destičky bylo vloženo po 1 ml z příslušné zkumavky. Destičky byly inkubovány (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po 24 h bylo do jednotlivých jamek přidáno po 1 ml HMI-9 s phleomycinem ve finální koncentraci 5 µg/ml. Po 6 dnech byly sledovány transformované buňky.

#### 4.3.7 Elektroporace DNA do procyklické formy *Trypanosoma brucei*

Pro jednu elektroporaci bylo přeneseno 5x10<sup>7</sup> WT buněk hmyzí formy *T. brucei* do zkumavky. Buňky byly stočeny (1300 g, 4 °C, 10 min). Výsledný pelet byl promyt v 10 ml ledového cytomixu při 4 °C. Složení cytomixu je uvedeno v tabulce 25. Buňky byly stočeny za stejných podmínek a poté k nim bylo přidáno 500 µl ledového cytomixu (4 °C).

Tabulka 25. Složení ledového cytomixu, skladování v -20 °C.

Složka	Objem
1M HEPES (Sigma)	2,5 ml
1M KCl (Sigma)	12 ml
1M CaCl <sub>2</sub> (Sigma)	15 µl
0,5 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	2 ml
0,5 M EDTA (Sigma)	400 µl
1M Glukóza (Lach-Ner)	600 µl
1M MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	500 µl
Voda	do 100 ml

Do 0,2 cm kyvety bylo nejprve vloženo 10 µg ledové linearizované sterilní DNA v objemu 5 µl, která byla poté resuspendována v 500 µl suspenze buněk v ledovém cytomixu. Následně došlo k elektroporaci na přístroji Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad) při



nastavení 1500 V, 500  $\Omega$ , 25 $\mu$ F. Po 10 vteřinách byl krok opakován s nastavením 1700 V, 500  $\Omega$ , 25 $\mu$ F. Buňky byly resuspendovány v 5 ml SDM-79 média, které obsahovalo nediferenciační antibiotika neomycin ve finální koncentraci 15  $\mu$ g/ml a hygromycin 50  $\mu$ g/ml.

Buňky byly inkubovány (27 °C, 48 h). Poté bylo do kultury přidáno 5 ml SDM-79 média, které obsahováno neomycin a hygromycin ve stejné koncentraci a phleomycin ve finální koncentraci 5  $\mu$ g/ml (dvojnásobné množství) a opět následovala inkubace za stejných podmínek. Poté byly buňky přeneseny do 96 jamkové destičky. Do každé jamky bylo vloženo 200  $\mu$ l kultury a 400  $\mu$ l SDM-79 média s neomycinem, hygromycinem při stejné koncentraci viz nahoře a phleomycinem 2,5  $\mu$ g/ml. Po 24 h byly vybrané narostlé jamky odebrány do kultivační nádoby s 5 ml SDM-79 média za stejných podmínek. Opět byla provedena elektroporace bez využití linearizované DNA.

#### 4.3.8 Příprava buněk pro izolaci RNA

Pro krevní a hmyzí formy *T. brucei* byly použito pět buněčných linií, WT, neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza pro fragment 1 a 2 a indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza pro fragment 1 a 2 v biologickém triplikátu. Před indukcí tetracyklinem, bylo přeneseno  $7,5 \times 10^4$  WT a neindukovaných buněk kmenu  $\Delta$ tbatpáza do 5 ml HMI-9 pro krevní formy a  $7,5 \times 10^5$  WT a neindukovaných buněk kmenu  $\Delta$ tbatpáza do 5 ml SDM-79 pro hmyzí formy *T. brucei* v kultivačních lahvích. Polovina kultivačních nádob obsahujíc transformované buňky byla indukována tetracyklinem ve finální koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Krevní formy a hmyzí formy byly inkubovány po dobu 48 h (Kap. 4.1).

#### 4.3.9 Izolace RNA z krevních a hmyzích forem *Trypanosoma brucei*

Buňky byly stočeny (1300 g, 4 °C, 10 min) a promyty sterilním PBS. Poté byly znovu stočeny za stejných podmínek. Z výsledného peletu byla pomocí sady High pure RNA isolation kit (Roche, CH) izolována mRNA dle protokolu výrobce. Koncentrace RNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop 2000. Získaná mRNA byla uložena při teplotě -80 °C před dalším použitím. Pro každý vzorek byla RNA zředěna na koncentraci 25 ng/ $\mu$ l.

#### 4.3.10 qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

qPCR bylo provedeno dle protokolu výrobce pomocí sady KAPA SYBR FAST One-Step (KAPA BIOSYSTEMS, US) (Tab. 26 a 27). Primery (Tab. 28) byly navrženy v programu Geneious. qPCR a následná analýza byla provedena pomocí přístroje CFX96 Real-time PCR instrument (Bio-Rad). Jako kontrolu byly využity stabilně exprimované „house keeping“ geny TERT (telomerická reverzní transkriptáza) a 18 S rRNA.

Výsledky byly zpracovány pomocí programů Excel (Microsoft, US) a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., CA, US). Data pro obě formy *T. brucei* byla před statistickou analýzou ověřena normalitou pomocí Shapiro-Wilkova testu a shodnost rozptylů pomocí Brown-Forsytheova testu. Poté byla provedena analýza jednocestné ANOVA, následovaná post-hoc Tukeyho testem. P-hodnota <0,05 byla považována za signifikantní. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Tabulka 26. Složení qPCR reakce

Složka	Objem
qPCR Master Mix (2x)	5 µl
Forward primer (5 µM)	0,5 µl
Reverse primer (5 µM)	0,5 µl
KAPA RT Mix (50X)	0,2 µl
Resuspendovat a vložit do jamky	
RNA (25 ng/µl)	3,8 µl

Tabulka 27. Průběh qPCR

Počet cyklů	Teplota	Čas
1x	42 °C	30 min
1x	95 °C	5 min
39x	95 °C	10 sek
	56 °C	20 sek
	72 °C	20 sek
1x	55 °C	5 sek
1x	95 °C	1 min

Tabulka 28. Primery využívané pro qPCR

Primery pro fragment 1

Směr	Sekvence
Reverse	5'-TGTTTCCACGCCACTCACTC-3'
Forward	5'-TCCCAAATCCTTCGCGTAGTTC-3'

Primery pro fragment 2

Směr	Sekvence
Reverse	5'-ACTTCATAGGCGGCTACTTGAC-3'
Forward	5'-ACGGGAACCATTACGAACGG-3'

Primery pro TERT

Směr	Sekvence
Reverse	5'-AGGAACTGTCACGGAGTTTGC-3'
Forward	5'-GAGCGTGTGACTCCGAAGG-3'

Primery pro 18S rRNA

Směr	Sekvence
Reverse	5'-GTCCGTTGACGGAATCAACC-3'
Forward	5'-ACGGAATGGCACCACAAGAC-3'

## 4.4 Lokalizace TbATPázy pomocí V5 značky

### 4.4.1 Primery a plazmidy

Primery (Tab. 29) byly navrženy v programu Geneious. Pro zaklonování genu do bakterií TOP10 byl využit plazmid pJET1.2/blunt. Pro zvýšení exprese proteinu byl použit finální plazmid pT7-3V5-PAC, který obsahuje puromycinovou rezistenci a zároveň má ve své nukleotidové sekvenci V5 značku, která slouží k lokalizaci proteinu (Flaspohler et al. 2010).

Tabulka 29. Primery používané pro určení lokalizace TbATPázy.

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Forward	5'-CAC <u>AAGCTT</u> ATGGAGGAGAACAACGCAACT-3'	<u>HindIII</u>
Reverse	5'-CAC <u>GGATCC</u> AATGATATCAATGAACTGTTCCCG-3'	<u>BamHI</u>

Následný proces klonování od izolace gDNA po vložení inzertu do plazmidu pT7-3V5-PAC odpovídá stejnému postupu jako v kapitole 4.2. DNA byla vložena do hmyzí formy *T. brucei* pomocí elektroporace, jak je popsáno v kapitole 4.3.7. V tomto případě bylo jako selekční antibiotikum použito puromycin ve finální koncentraci 1 µg/ml.

### 4.4.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii

Následující protokol platí pro přípravu jednoho preparátu. Do zkumavky bylo přeneseno 0,5 ml buněk. K buňkám bylo přidáno barvivo MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) ve finální koncentraci 1 µM a následovala inkubace (27 °C, 10 min) v otevřené zkumavce. Buňky byly stočeny (1500 g, 27 °C, 5 min) a promyty 0,5 ml SDM-79. Poté byly buňky inkubovány (27 °C, 20 min) v otevřené zkumavce. Buňky byly stočeny za stejných podmínek a promyty 0,5 ml sterilním PBS. Poté byly buňky přeneseny na podložní sklo a inkubovány (27 °C, 10 min).

Pro fixaci a permeabilizaci membrán, aby se do buněk dostaly protilátky, byla použita kombinace methanolu a acetonu. Nejdříve byl preparát fixován v chlazeném methanolu (-20 °C, 5 min), a poté byla membrána buněk permeabilizována v chlazeném acetonu (-20 °C, 5 min).

Po fixaci byl preparát blokován po dobu 1 h v PEMBALG roztoku (Tab.30). Následně byl odsán PEMBALG roztok. Preparát byl poté převrstven a inkubován primární V5-mýší protilátkou v PEMBALG roztoku v poměru 1:1000 po dobu 1 h. Po inkubaci byla primární protilátka odsáta a preparát byl promyt 3x v intervalu 10 min v 1x PEM pufriu (Tab.31). Poté byl odsát 1x PEM. Dále byl preparát převrstven a inkubován v sekundární protilátce anti-mýší Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) v PEMBALG roztoku v poměru 1:1000 po dobu 1 h. Vzorek byl opět promýván 3x v intervalu 10 min v 1x PEM pufriu. Na podložní sklo byla přidána kapka montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, US), která byla přiklopena krycím sklem. Krycí sklo bylo k podložnímu sklu zafixováno pomocí laku na nehty.

Tabulka 30. Složení PEMBALG roztoku

Složení	Množství/objem
1xPEM pufr (Tab. 31)	100 ml
1 % BSA (Sigma)	1 g
100 mM Lysin (Sigma)	1,8g
0,5 % Želatina (Sigma)	0,5g

Tabulka 31. Složení 1xPEM pufru

Složení	Množství/objem
200 mM PIPES (Sigma)	30,2 g
0,5 M EGTA (Sigma)	2 ml
1M MgSO <sub>4</sub> (Lachema)	100 µl
Voda	doplnit do 500 ml
Upravit pH na 6,9	
Autoklávování	

Jako negativní kontrolu byly použity WT buňky, které neobsahují V5 značku ve svém genomu, a indukované buňky, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Tím bylo ověřeno, zda se jedná o specifický signál. Pro zjištění lokalizace proteinu byla použita králičí protilátka proti BiP (Jay Bangs) a protilátka proti KDEL sekvenci (Thermo Fischer Scientific). Během kolokalizace cíleného proteinu a proteinového markeru nebyly buňky inkubovány v MitoTrackeru. Primární protilátky proteinů pocházely z jiných zvířat, aby se sekundární protilátka vážala na primární protilátku.

#### 4.4.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie byla prováděna pomocí invertovaného konfokálního mikroskopu TCS SP8 WLL SMD-FLIM (Leica, DE). Výsledné fotografie byly zpracovány v programu Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, NL) a následně upraveny v programu Fiji (ImageJ, US) (Schindelin et al. 2012).

### 4.5 Identifikace role genu pomocí funkční komplementace

Tato část diplomové práce se zabývala studiem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které mají defektní gen *ccc2* (dále CCC2Δ). Tento gen kóduje ATPázu P1B typu, umístěnou v trans-Golgi, která má za úkol přenášet měď z cytoplazmy do Golgiho aparátu (GA), kde se

měď integruje do cílových apoproteinů. Cílem experimentu bylo vložit *tbatpázu* do kvasinek CCC2Δ a zjistit, zda TbATPáza dokáže nahradit funkci CCC2. Kvasinky CCC2Δ nejsou schopny účinně začlenit měď do multicopper oxidázy, důležitého enzymu pro příjem železa. Proto bylo předpokládáno, že při limitovaném množství železa nebudou schopny narůst.

Pro kontrolu byl vložen prázdný plazmid PCM189 do kvasinek (CCC2Δ) a WT. Plazmid pCM189 umožňuje kvasinkám syntetizovat uracil. Proto proběhla selekce při transformaci na plotnách bez přítomnosti uracilu (SC-U). Následovala funkční analýza genu pomocí komplementace. Transformované kvasinky byly pěstovány na specifických plotnách a byl porovnáván jejich růst s WT. Úspěšná komplementace by byla patrná z podobného růstu jako u WT.

Jako selekční podmínka byla zvolena přítomnost chelátoru železa BPS (Tab.32) ve finální koncentraci 22 μM. Další selekční podmínkou bylo přidání doxycyklinu (Tab. 32) na plotny. Toto antibiotikum blokuje transkripci na promotoru plazmidu PCM189. Proto by měli za těchto podmínek růst pouze WT kvasinky. Koncentrace doxycyklinu v zásobním roztoku byla 0,5 μg/ml. Seznam použitých selekčních podmínek je uveden v Tab. 32. Plotna dále obsahovala 30 ml LB média.

Tabulka 32. Selekční podmínky během komplementace

Selekční podmínka	Objem	Efekt
50 mM BPS	13,2 μl	snižuje dostupnost železa pro kvasinky
Doxycyklin (0,5 μg/ml)	120 μl	zabraňuje transkripci genu v pCM189

#### 4.5.1 Primery a plazmid

Primery (Tab. 33) byly navrženy v programu Geneious. Gen pro TbATPázu byl zaklonován do plazmidu PCM189, který obsahuje ampicilinovou rezistenci. Následný proces od izolace gDNA z *T. brucei* po transformaci plazmidu PCM189 s inzertem do bakterií TOP10 a izolaci plazmidové DNA z TOP10 bakterií probíhal stejným způsobem jako v kapitole 4.2.

Tabulka 33. Primery pro amplifikaci *tbatpázy* využívané pro funkční komplementaci

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Reverse	5'-CACGCGGCCGCCTAAATGATATCAATGAACTGTTCC-3'	<u>NotI</u>
Forward	5'-CACGGATCCATGGAGGAGAACAACGCAAC-3'	<u>BamHI</u>

#### 4.5.2 Kultivace kmenů *Saccharomyces cerevisiae* před transformací

WT a CCC2Δ kmeny *S. cerevisiae* byly inkubovány na plotně obsahující 30 ml YPAD média s agarem (30 °C, 48 h) (Tab. 34).

Tabulka 34. Složení YPAD média.

Složka	Hmotnost/objem
Adenin (Sigma)	25 mg
Pepton (Oxoid)	5 g
Kvasinkový extrakt (Sigma)	2,5 g
Agar	3,75 g
40% Glukóza (Lach-Ner)	12,5 ml
PenStrep 100x (Gibco)	2,5 ml
Voda	235 ml

#### 4.5.3 Transformace do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Transformace kmenů WT a CCC2Δ *S. cerevisiae* byla provedena dle protokolu (Gietz a Schiestl 2007). Do kmenu WT *S. cerevisiae* byl vložen pouze samotný plazmid PCM189, zatímco do kmenu CCC2Δ *S. cerevisiae* byly provedeny dvě transformace: jedna s plazmidem PCM189 obsahujícím inzert a druhá s plazmidem PCM189 bez inzertu. Složení médií 2xYPAD a SC-U je uvedeno v tabulkách 35 a 36.

Tabulka 35. Složení 2xYPAD média.

Složka	Hmotnost/objem
Adenin (Sigma)	25 mg
Pepton (Oxoid)	5 g
Kvasinkový extrakt (Sigma)	2,5 g
Agar (Sigma)	3,75 g
40% Glukóza (Lach-Ner)	25 ml
PenStrep 100x (Gibco)	2,5 ml
Voda	222,5 ml

Tabulka 36. Složení SC-U média.

Složka	Hmotnost/objem
YNB (Sigma)	1,68 g
YMS – URA (Sigma)	0,48 g
MES (Sigma)	2,5 g
Adenin (Sigma)	25 mg
Voda	237,5 ml
Upravit pH na 6,5	
Agar (Sigma)	3,75 g
Autoklávovat	
40 % glukóza (Lach-Ner)	12,5 ml
PenStrep 100x (Gibco)	2,5 ml

#### 4.5.4 Komplementace

Izolované kolonie z každé transformované plotny byly nanесeny sterilní špičkou do 50 ml zkumavky obsahující 3 ml SC-U média a byly třepány (220 RPM, 30 °C, 16 h). Poté bylo změřeno OD<sub>600</sub> kvasinek a následně byly kvasinky naředěny na OD<sub>600</sub> = 0,2. Pro každou transformovanou buněčnou linii byla z naředěné kultury vytvořena desítková ředící řada v 96jamkové destičce. Na plotnu se selekčním médiem bylo nanесeno 5 μl z každé jamky. Kvasinky na plotnách byly poté inkubovány (30 °C, 72 h). Po uplynutí této doby byly plotny naskenovány a výsledky byly odvozeny podle nárůstu kolonií.

#### 4.6 Poloviční inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>)

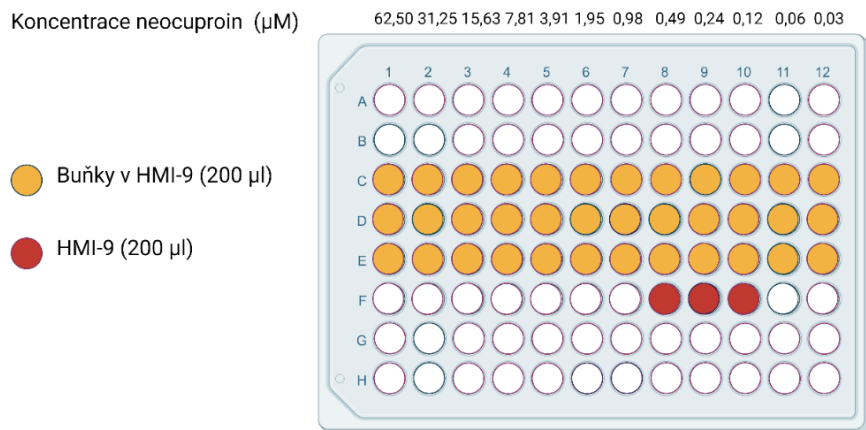
Jedná se o standardní metodu využívanou pro vyhodnocení účinnosti látek. Bylo zkoumáno, při jaké koncentraci látky dochází k polovičnímu snížení růstu u *T. brucei*. Mezi testované látky byly zařazeny zdroj mědi CuSO<sub>4</sub> a chelátor mědi neocuproin (Sigma). Tyto látky mají vytvořit prostředí o nadbytku a nedostatku mědi pro buňky *T. brucei*.

##### 4.6.1 Příprava vzorků

Koncentrace hmyzích forem včetně krevních forem *T. brucei* byla změřena pomocí přístroje Cell Counter (Beckman Coulter). Výchozí koncentrace pro krevní formu byla 1,5x10<sup>4</sup> buněk/ml a 5x10<sup>5</sup> buněk/ml pro hmyzí formu. Experiment byl proveden v biologickém triplikátu.

##### 4.6.2 Nasazení buněk do destičky a inkubace v resazurinu

V rámci jedné řady bylo do první jamky přidáno 200 μl adekvátního média s testovanou látkou (CuSO<sub>4</sub> nebo neocuproin). Koncentrace roztoků testovaných látek pro hmyzí a krevní formy jsou uvedeny v tabulce 37. Do ostatních jamek v řadě bylo přidáno 100 μl adekvátního média. Následně byla testovaná látka pomocí dvojkové ředící řady přidána do zbylých jamek v řadě. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 μl buněk *T. brucei* (koncentrace viz 4.6.1). Testovány byly u hmyzí a krevní formy WT, neindukovaný kmen Δtbatpáza a kmen Δtbatpáza se sníženou TbATPázou. Testované kmene Δtbatpáza byly vytvořeny pomocí RNA interference, pomocí fragmentu 1 u krevní formy a fragmentu 2 u hmyzí formy. Jako kontrola byly použity jamky obsahující pouze médium v objemu 200 μl (**Obr. 9**). Pro zabránění vypaření média z jamek, byly zbylé jamky dolity 100 μl adekvátním médiem a následně byly destičky umístěny do vlhké komůrky. Destičky byly poté přeneseny do termostatu. Buňky hmyzí formy a krevní formy byly poté inkubovány 72 h (Kap. 4.1).



Obrázek 9. Design 96jamkové destičky  $IC_{50}$  pro neocuproin u krevní formy WT *T. brucei*. V řadách C-E se vyskytují buňky *T. brucei* o různé koncentraci neocuproinu, přičemž se jedná o dvojkové ředění. Jako kontrola slouží jamky G8-G10, které obsahují pouhé médium o stejném objemu jako testované jamky (200  $\mu\text{l}$ ). Ostatní jamky jsou naplněny do 100  $\mu\text{l}$  médiem, aby se zabránilo případnému odpařování vzorků.

Tabulka 37. Výchozí koncentrace roztoků testovaných látek při testování  $IC_{50}$

Forma a buněčná linie <i>T. brucei</i>	Testovaná látka	Koncentrace
Krevní forma WT	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	1 mM
Krevní forma kmen $\Delta\text{tbatpáza}$ se sníženou TbATPázou	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	400 $\mu\text{M}$
Hmyzí forma WT	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	80 mM
Hmyzí forma kmen $\Delta\text{tbatpáza}$ se sníženou TbATPázou	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	16 mM
Krevní forma WT	Neocuproin (Sigma)	125 $\mu\text{M}$
Hmyzí forma WT	Neocuproin (Sigma)	30 $\mu\text{M}$

Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 2  $\mu\text{l}$  0,2% resazurinu (Sigma). Resazurin je modro-fialové barvivo, které aktivní životaschopné buňky redukují na rezorufin, což způsobuje barevnou změnu. Resazurin se proto používá jako barvivo pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  u živých buněk.

Destičky byly následně inkubovány (Kap. 4.1). Po 2 h inkubace u hmyzích forem a 4 h inkubace u krevních forem *T. brucei* byla pomocí spektrometru Synergy MX (BioTek-Instruments, US) změřena fluorescence při excitaci 544 nm a emisi 590 nm. Signál fluorescence živých buněk by měl být alespoň 10krát vyšší než signál negativní kontroly.

Výsledné hodnoty byly získány v podobě excelové tabulky ze spektrometru Synergy MX. Následně byly výsledky zpracovány v programu GraphPad Prism, kde byly stanoveny hodnoty IC a vytvořena křivka „dose response“, která vyjadřuje vztah mezi koncentrací testované látky a počtem buněk. Data pro obě formy *T. brucei* byla před statistickou analýzou ověřena normalitou pomocí Shapiro-Wilkova testu a shodnost rozptylu pomocí Fisherova testu. Poté byl proveden Studentův t-test pro porovnání  $IC_{50}$  porovnávaných skupin. P-hodnota  $<0,05$  byla považována za signifikantní. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

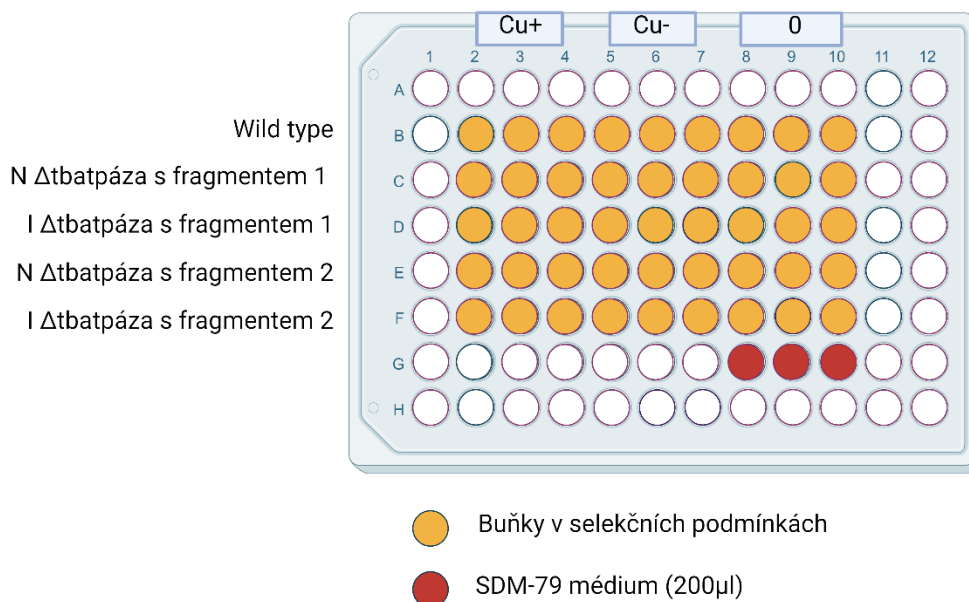


## 4.7 Vliv mědi na fenotyp *Trypanosoma brucei*

Pomocí kalkulačky GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Ecanything1/>) byly z naměřených hodnot  $IC_{50}$  stanoveny koncentrace  $IC_{10}$   $CuSO_4$  pro indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza (0,12 mM pro hmyzí formu a 1,34  $\mu$ M pro krevní formu) a  $IC_{10}$  neocuproin pro kmen WT (0,33  $\mu$ M pro hmyzí formu a 1,18  $\mu$ M pro krevní formu) k testování buněčného růstu krevní a hmyzí formy *T. brucei*.

Cílem bylo vytvořit mírný stres pro kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou, přičemž výchozí koncentrace není nikterak limitující pro kontrolní skupiny WT a neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza. Za těchto podmínek bylo předpokládáno, že kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou bude růst pomaleji než kontrolní skupiny, neboť vlivem absence TbATPázy nebude schopen efektivně detoxifikovat měď. Experiment byl proveden v biologických triplikátech. Pro krevní a hmyzí formu *T. brucei* byly využity buněčné linie WT, neindukované kmene  $\Delta$ tbatpáza a kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou.

Pro každou řadu, ve které byla buněčná linie, bylo do prvních tří jamek přidáno 10  $\mu$ l roztoku  $CuSO_4$ , do následujících tří 10  $\mu$ l neocuproinu a zbylé tři jamky byly doplněny 100  $\mu$ l adekvátním médiem. Roztoky  $CuSO_4$  a neocuproin byly dolity do 100  $\mu$ l adekvátním médiem. Poté byly do všech jamek vloženy buňky v objemu 100  $\mu$ l, přičemž koncentrace buněk byla stejná jako v kapitole 4.6.1. Jako kontrola bylo nalito 200  $\mu$ l adekvátního média do tří prázdných jamek (**Obr. 10**). Koncentrace  $CuSO_4$  a neocuproinu jsou uvedeny v tabulce 38. Výsledné 96jamkové destičky byly inkubovány za stejných podmínek jako v kapitole 4.6.2. Poté byl přidán resazurin a dále se postupovalo obdobně jako v kapitole 4.6.2.



Obrázek 10. Příkladový design 96jamkové destičky při testování toxicity mědi. V řadách B-F se vyskytují odlišné buněčné linie. V druhé až čtvrté jamce se vyskytují buňky *T. brucei* ve vyšší koncentraci mědi oproti médiu. V páté až sedmé jamce se vyskytují buňky *T. brucei* v nižší koncentraci mědi oproti médiu. V osmé až desáté jamce se vyskytují buňky *T. brucei*. Jako kontrola slouží jamky G8-G10, které obsahují pouhé médium o stejném objemu jako testované jamky (200  $\mu$ l). Ostatní jamky

jsou naplněny do 100  $\mu$ l médiem, aby se zabránilo případnému odpařování vzorků. Cu+ (CuSO<sub>4</sub>); Cu- (neocuproin); N (neindukovaný kmen); I (indukovaný kmen = se sníženou TbATPázou).

Tabulka 38. Koncentrace testovaných látek

Forma a buněčná linie <i>T. brucei</i>	Testovaná látka	Koncentrace
BSF SM indukovaný kmen $\Delta$ tbatpáza	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	26,8 $\mu$ M
29-13 indukovaný kmen $\Delta$ tbatpáza	CuSO <sub>4</sub> (Lachema)	2,4 mM
BSF SM WT	Neocuproin (Sigma)	23,6 $\mu$ M
29-13 WT	Neocuproin (Sigma)	13,2 $\mu$ M

Data byla před statistickou analýzou ověřena normalitou pomocí Shapiro-Wilkova testu a shodnost rozptylů pomocí Brown-Forsytheova testu. Poté po provedení jednocestné analýzy ANOVA, následoval post-hoc Tukeyho test. P-hodnota <0,05 byla považována za signifikantní. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka).

## 4.8 Růstová křivka

Při testování byly použity WT a neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza pro fragment 2 v biologickém tetraplikátu u hmyzí formy *T. brucei*. Nejdříve bylo nasazeno  $7,5 \times 10^6$  buněk do 5 ml média SDM-79. Koncentrace buněk byla změřena pomocí přístroje Cell Counter (Beckman Coulter). Po 48 h byl k WT a polovině buněk neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza přidán 96% ethanol v poměru 1:1000 a k druhé polovině buněk neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza přidán tetracyklin. Poté proběhla inkubace (27 °C, 24 h). Následně byl každý vzorek přenesen do dvou různých podmínek, do SDM-79 média a do SDM-79 s přidanou mědí ve finální koncentraci 0,12 mM. Měření probíhalo každých 24 h po dobu 6 dní.

Jelikož bylo před experimentem opakovaně otestováno, že kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou narostl za 48 h stejně jako kmen WT v médiu, byla nakonec testován kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou při zvýšené koncentraci mědi oproti ostatním kontrolním skupinám v médiu a v médiu o přidané mědi.

Výsledky byly zpracovány v programu GraphPad Prism a Excel. Pro všechny buněčné linie byl spočítán doubling time neboli doba zdvojení buněk *T. brucei*. Dále byla data před statistickou analýzou ověřena normalitou pomocí Shapiro-Wilkova testu a shodnost rozptylů pomocí Levenova testu. Statistika byla provedena pomocí analýzy dvoucestné ANOVA, přičemž vyhodnoceny signifikantní interakce. Proto byla provedena jednocestná ANOVA analýza se skupinami v médiu s přidanou mědí a Dunnettův test pro porovnávání kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou s WT a neindukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza v médiu s přidanou mědí. P-hodnota <0,05 byla považována za signifikantní. Výsledná růstová křivka a doubling time byly doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

## 4.9 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS)

Tato metoda byla využita pro stanovení množství mědi v *T. brucei*. Při testování byly použity stejné buněčné linie jako v kapitole 4.6. Cílem experimentu bylo stanovit množství mědi u *T. brucei* a určit, zda dochází ke změně v obsahu mědi u buněk *T. brucei* vlivem snížené TbATPázy.

V biologickém tetraplikátu bylo pro každý vzorek nasazeno  $1,5 \times 10^7$  buněk krevní formy do 50 ml HMI-9 a  $5 \times 10^7$  buněk hmyzí formy do 10 ml SDM-79. Následně byly buňky *T. brucei* inkubovány (Kap. 4.1), přičemž na začátku inkubace byl k WT přidán 96% ethanol a k neindukovanému kmenu  $\Delta$ tbatpáza tetracyklin v poměru 1:1000. Po 24 h byl každý vzorek nasazen do dvou odlišných podmínek (Kap. 4.8), přičemž pro každý vzorek krevní formy bylo nasazeno  $1,5 \times 10^6$  buněk do 50 ml HMI-9 a pro každý vzorek hmyzí formy  $1,5 \times 10^7$  buněk do 10 ml SDM-79. Po 48 h byly buňky stočeny (1300 g, 4 °C, 10 min) a promyty v 10 ml ARBON média s EDTA ve finální koncentraci 10 mM. Výsledné pelety byly resuspendovány v 10 ml ARBON médiu (Tab. 39) s EDTA ve finální koncentraci 10 mM. Opět byly stočeny a promyty v 1 ml ARBON médiu. Vzorek byl přenesen do předem zvážené zkumavky. Supernatant byl odsát a zkumavka byla umístěna na termální bloček, kde byl pelet sušen při 100 °C po dobu alespoň 1 h. Vysušené pelety ve zkumavkách byly zváženy, aby byla zjištěna hmotnost sušiny. Poté byly vzorky předány do laboratoře plazmové spektrometrie (Laboratoř geologických ústavů UK, Albertov 6), kde byly analyzovány na přístroji X Series II, iCAP Q ICP-MS (Thermo Fisher Scientific).

Výsledky byly zpracovány v programu GraphPad Prism a Excel. Před statistickou analýzou byla data ověřena normalitou pomocí Shapiro-Wilkova testu, shodnost rozptylů pomocí Levenova testu nebyla zjištěna, nicméně byl předpokládán. Statistika byla provedena pomocí testu dvoucestné ANOVA analýzy. P-hodnota  $<0,05$  byla považována za signifikantní. Jelikož pomocí dvoucestné ANOVA analýzy byla zjištěna signifikantní interakce, byly buněčné linie testovány pomocí jednocestné ANOVA analýzy ve stejném prostředí (médiu nebo médiu s přidanou mědí) za předpokladu normality dat a shodného rozptylu. Poté byla data vyhodnocena pomocí Tukeyho testu. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Tabulka 39. Složení ARBON média

Složka	Koncentrace
HEPES	10 mM
KCl	2,7 mM
NaCl	154 mM
Glukóza	11 mM
NaHCO <sub>3</sub> pH 7,3	24 mM

## 4.10 Hmotnostní spektrometrie

U krevních forem WT *T. brucei* byla prováděna identifikace proteinů, u nichž dochází ke změně exprese při zvyšování nebo snižování koncentrace mědi ve srovnání s proteiny exprimovanými ve standardním médiu, pomocí hmotnostní spektrometrie. Před přípravou vzorků byly testovány různé násobky koncentrace  $IC_{50}$  pro neocuproin a  $CuSO_4$ , při kterých docházelo k poklesu růstu buněk ve srovnání s kontrolním médiem HMI-9, aby byly vytvořeny stresové podmínky nadbytku a nedostatku mědi pro *T. brucei*. Pro hmotnostní spektrometrii byla zvolena koncentrace  $\frac{1}{2} IC_{50} = 10 \mu M$  pro  $CuSO_4$  a  $2x IC_{50} = 4 \mu M$  pro neocuproin. Růst krevní formy *T. brucei* je těmito koncentracemi inhibován o třetinu.

V biologickém tetraplikátu bylo pro každý vzorek nasazeno  $1,5 \times 10^5$  WT buněk krevní formy *T. brucei* v objemu 5 ml HMI-9. Následně byly buňky inkubovány po dobu 48 h (Kap 4.1). Poté byla každá kultivační lahev rozdělena do tří nových. Do dvou kultivačních lahví bylo nasazeno  $1,5 \times 10^6$  v objemu 5 ml HMI-9, přičemž do jedné bylo přidáno  $CuSO_4$  ve finální koncentraci  $10 \mu M$  a do druhé neocuproin ve finální koncentraci  $4 \mu M$ . Do třetí kultivační nádoby bylo nasazeno  $1 \times 10^6$  buněk v objemu 5 ml HMI-9. Buňky byly inkubovány po dobu 24 h (Kap. 4.1) a poté byly stočeny (1300 g,  $4 \text{ }^\circ C$ , 15 min). Výsledné pelety byly promyty v 0,5 ml sterilně chlazeném PBS ( $4 \text{ }^\circ C$ ) a znovu stočeny a promyty v 0,5 ml chlazeného PBS ( $4 \text{ }^\circ C$ ). Výsledná směs byla přenesena do menších zkumavek a znovu stočena. Pelety ve zkumavkách byly předány do laboratoře OMICS – proteomika (BIOCEV). Po celou dobu experimentu byly buňky udržovány při teplotě  $4 \text{ }^\circ C$ .

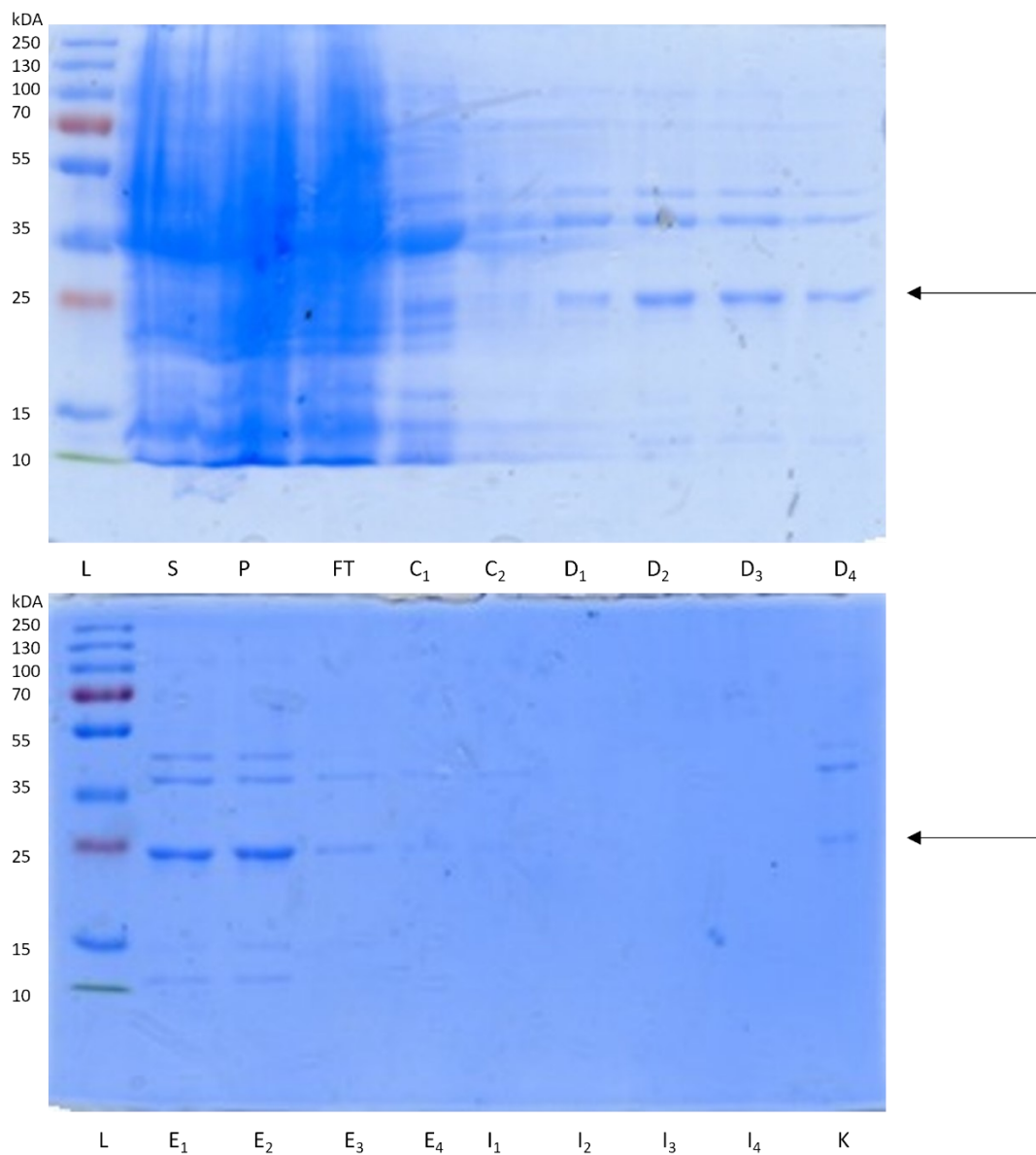
## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava polyklonální protilátky proti TbATPáze

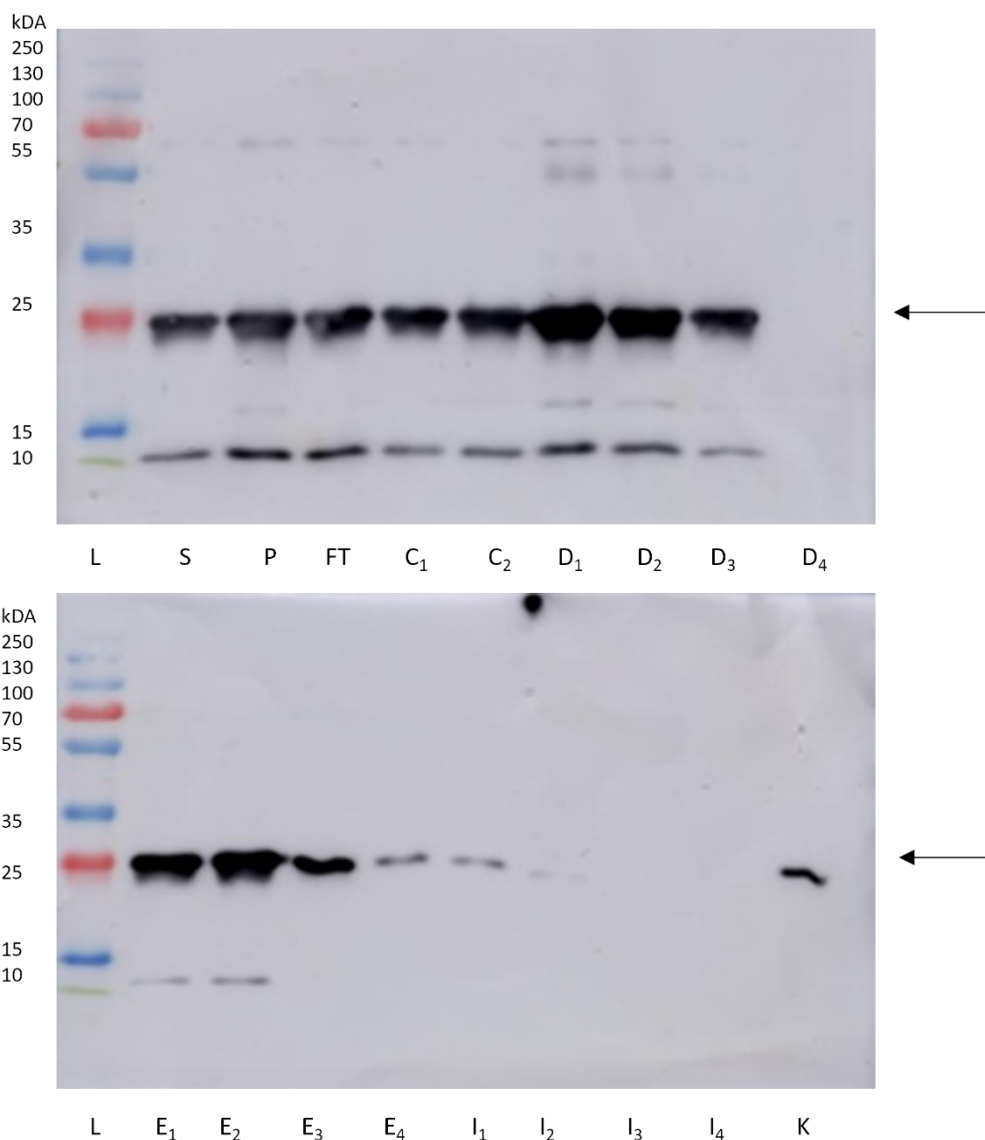
TbATPáza byla identifikována jako ATPáza P1B typu, která se podílí na transportu mědi (Isah et al. 2020). Pro určení lokalizace TbATPázy a stanovení její exprese u forem *T. brucei* jsme se rozhodli vytvořit polyklonální protilátku v potkanovi. Vytvořená polyklonální protilátka proti zkrácené verzi TbATPázy byla testována na lyzátech, membránové a cytosolické frakci WT a dále na lyzátech neindukovaného kmene  $\Delta tbatpáza$  a kmene  $\Delta tbatpáza$  se sníženou TbATPázou *T. brucei*.

#### 5.1.1 Purifikace TbATPázy s histidinovou značkou

Gen pro *tbatpázu* byl úspěšně zaklonován do plazmidu pET42b obsahujícího histidinovou značku, a následně byla provedena transformace do bakterií *E. coli* kompetentního kmene BL21. Poté byla provedena kontrola exprese. Avšak bakterie *tbatpázu* neexprimovaly. Vzhledem k tomu, že TbATPáza obsahuje 8 transmembránových domén (Isah et al. 2020), byla do bakterií *E. coli* kompetentního kmene BL21 vložena zkrácená cytosolická verze TbATPázy. Poté byla znovu otestována kontrola exprese zkrácené verze TbATPázy, avšak opět nebyla zaznamenána exprese proteinu. Zkrácená verze proteinu byla poté vložena do geneticky modifikovaných kmenů *E. coli* Rosetta (DE3) Competent Cells a Rosetta 2(DE3), které jsou schopny translatovat více kodónů, čímž je zvýšená pravděpodobnost translace proteinu. Zkrácenou verzi TbATPázy byly *E. coli* Rosetta 2(DE3) schopny exprimovat (27 °C, 16 h). Poté následovala izolace TbATPázy za denaturačních podmínek pomocí niklové kolony (Poly-Prep Chromatography Column), na kterou se vážala histidinová značka proteinu. Na základě výsledku izolace proteinu byla určena úspěšná purifikace zkrácené verze TbATPázy (**Obr. 11**). Frakce E1 a E2 byly použity jako materiál pro tvorbu polyklonální protilátky v laboratorním potkanovi. Dále byla potvrzena zkrácená verze TbATPázy s histidinovou značkou pomocí metody western blot (**Obr. 12**).



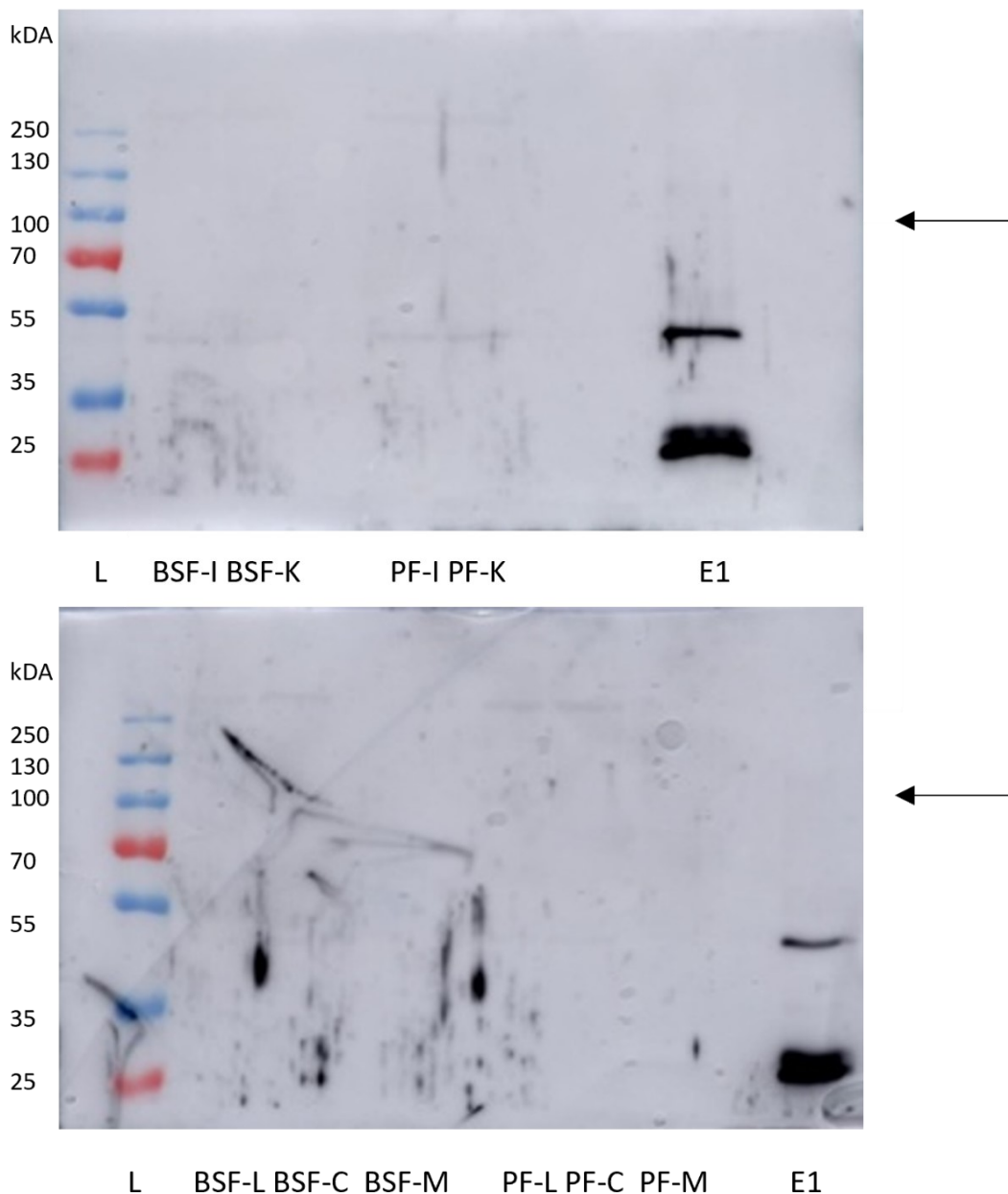
Obrázek 11. Výsledek purifikace zkrácené části TbATPázy na SDS-PAGE gelu. Šipka označuje velikost sledovaného proteinu. L: proteinový standard, S: supernatant, P: pelet, FT: Vzorek nezachycený na koloně, C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>: vzorky promyté pufrům C, D<sub>1</sub>-D<sub>4</sub>: vzorky promyté pufrům D, E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub> vzorky promyté pufrům E, I<sub>1</sub>-I<sub>4</sub> vzorky promyté v imidazolu, K: vzorek proteinu, který zůstal na niklových kuličkách.



Obrázek 12. Výsledek purifikace zkrácené části TbATPázy pomocí metody western blot. Šipka označuje velikost sledovaného proteinu. L: proteinový standard, S: supernatant, P: pelet, FT: Vzorek nezachycený na koloně, C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>: vzorky promyté pufrém C, D<sub>1</sub>-D<sub>4</sub>: vzorky promyté pufrém D, E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub> vzorky promyté pufrém E, I<sub>1</sub>-I<sub>4</sub> vzorky promyté v imidazolu, K: vzorek proteinu, který zůstal na niklových kuličkách.

### 5.1.2 Testování polyklonální protilátky

Metodou western blot byla testována polyklonální protilátka proti zkrácené části TbATPázy. Jako pozitivní kontrola byla použita zkrácená verze TbATPázy purifikovaná za denaturačních podmínek. TbATPáza v lyzátech a frakcích nebyla rozpoznána, avšak byl rozpoznán purifikovaný protein zkrácené části TbATPázy.



Obrázek 13. Detekce zkrácené části TbATPázy na membráně pomocí metody western blot. Šipka označuje velikost sledovaného proteinu. L: proteinový standard, BSF-I: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza krevní formy *T. brucei*, BSF-K: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza krevní formy *T. brucei*, PF-I: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza hmyzí formy *T. brucei*, PF-K: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza hmyzí formy *T. brucei*, BSF-L: lyzát WT krevní formy, BSF-C: vzorek cytosolické frakce WT krevní formy, BSF M: vzorek membránové frakce WT krevní formy, PF-L: lyzát WT hmyzí formy, PF-C: vzorek cytosolické frakce WT hmyzí formy, PF-M: vzorek membránové frakce WT hmyzí formy, E1: vzorek naředěné frakce E1 o velikosti 25 kDa ( $\pm$  2,5 $\mu$ g).

## 5.2 Snížení exprese pomocí metody RNAi

V rámci RNAi byly vytvořeny fragmenty 1 a 2, které byly vytvořeny ke snížení mRNA *tbatpázy*. Tyto fragmenty se podařilo zaklonovat do plazmidu p2T7-177. Proběhla úspěšná

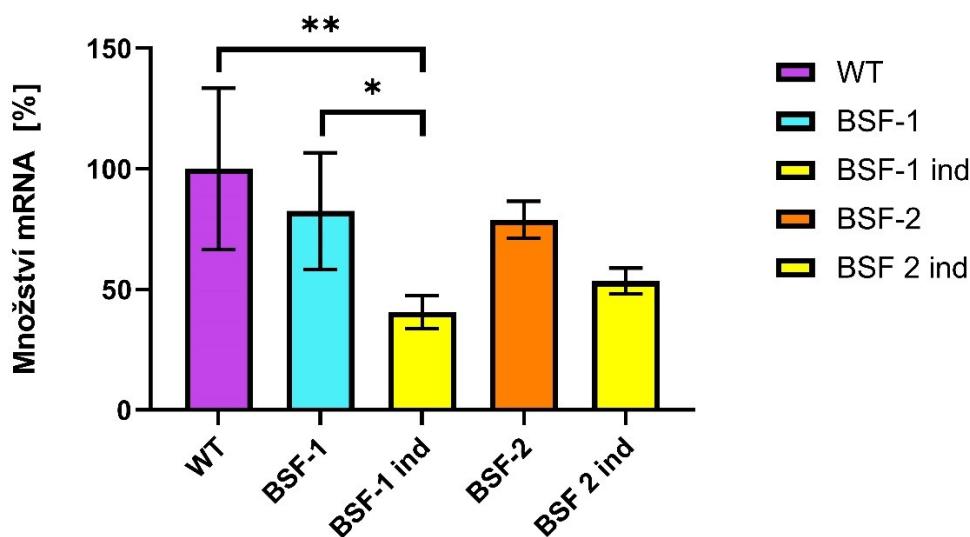


elektroporace plazmidové DNA do krevní a hmyzí formy *T. brucei*. Byly vytvořeny 4 transformované buněčné linie pro hmyzí a krevní formy *T. brucei*, neindukovaný kmen s fragmenty 1 a 2 a indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmenty 1 a 2. Buňky byly inkubovány (Kap. 4.1) po dobu 48 h. Následně byla z buněčných linií včetně WT krevních a hmyzích forem *T. brucei* izolována RNA. Úspěšná RNAi byla vyhodnocena, když se množství mRNA *tbatpázy* indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza významně lišilo od kontrolních skupin WT a neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza, a zároveň když se množství mRNA *tbatpázy* nelišilo v rámci kontrolních skupin. Poté byl provedena analýza jednocestné ANOVA, následovaná post-hoc Tukeyho testem. Hodnoty p jsou zobrazeny a popsány v obrázcích. 14 a 15.

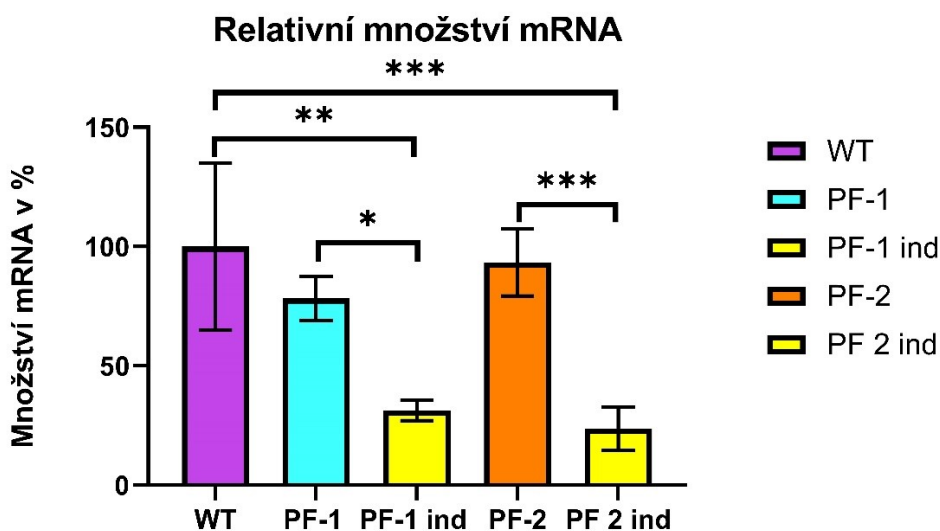
RNAi u krevní formy *T. brucei* při použití fragmentu 1 vedla ke snížení mRNA *tbatpázy* o 59,4 % u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1 ve srovnání s WT. Konkrétně množství mRNA *tbatpázy* bylo sníženo na  $40,6 \pm 2,3$  % u indukovaných  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1, a na  $82,5 \pm 8,1$  % u neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1 oproti WT. RNAi u krevní formy *T. brucei* při použití fragmentu 2 byla vyhodnocena jako neúspěšná, jelikož nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v množství mRNA mezi neindukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza ( $78,9 \pm 2,5$  %) a indukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza ( $53,5 \pm 1,8$  %) (**Obr. 14**). Kvůli čemuž byly pro další experimenty využity buněčné linie s fragmentem 1 (Kap. 4.6 a 4.9).

RNAi u hmyzí formy *T. brucei* při použití fragmentu 1 vedlo ke snížení množství mRNA *tbatpázy* o 68,7 % u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1 ve srovnání s WT. Konkrétně množství mRNA *tbatpázy* bylo sníženo na  $31,3 \pm 1,4$  % u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1, a na  $78,3 \pm 3,1$  % u neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1 oproti WT. Dále se podařilo snížit množství mRNA *tbatpázy* pomocí fragmentu 2 o 76,3 % u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2 vůči WT. Konkrétně množství mRNA *tbatpázy* bylo sníženo na  $23,7 \pm 3$  % u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1, a na  $93,4 \pm 4,7$  % u neindukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2 oproti WT (**Obr. 15**). V dalších experimentech byly využity buněčné linie s fragmentem 2, jelikož u těchto linií bylo zaznamenáno vyšší snížení mRNA *tbatpázy* (Kap. 4.6, 4.8 a 4.9).

### Snížení mRNA *tbatpázy* u krevní formy *T. brucei*



Obrázek 14. Výsledek qPCR pro krevní formy *T. brucei* v biologickém triplicátu. Snížení množství mRNA *tbatpázy* se podařilo u indukovaného kmene  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; WT: wild type; BSF1: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1; BSF1-ind: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1; BSF2: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2; BSF2-ind: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2. Statistika provedena pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

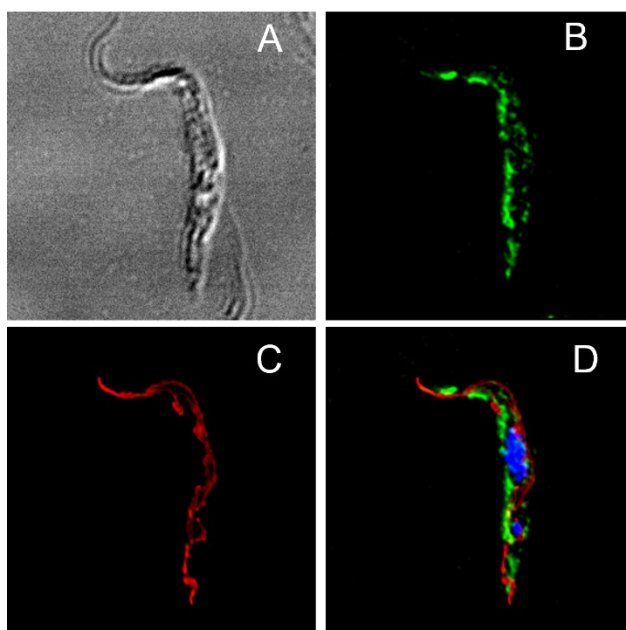


Obrázek 15. Výsledky qPCR pro hmyzí formy *T. brucei* v biologickém triplicátu. Snížení množství mRNA *tbatpázy* se podařilo u obou indukovaných kmenů  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1 a 2. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; WT: wild type; PF1: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1; PF1-ind: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1; PF2: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2; PF2-ind: indukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2. Statistika provedena pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

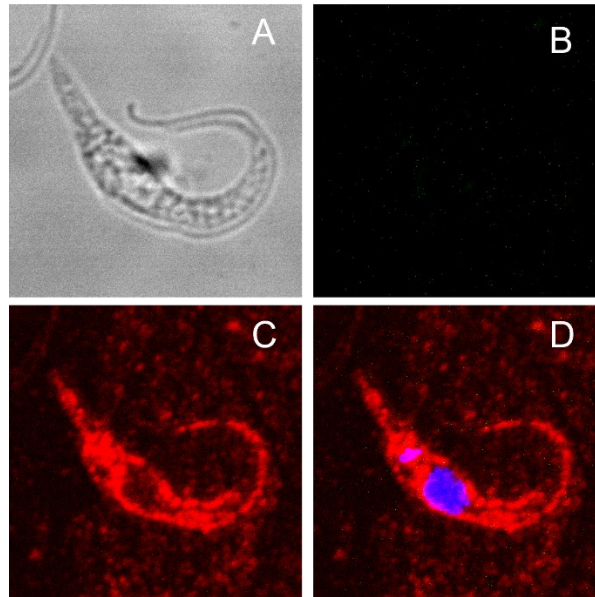
### 5.3 Lokalizace TbATPázy pomocí V5 značky

Pro určení lokalizace TbATPázy v buňce *T. brucei* byla použita metoda exprese fluorescenčně značeného proteinu. Gen kódující TbATPázu se úspěšně podařil zaklonovat do plazmidu pT7-3V5-PAC obsahujícího V5 značku. Plazmid s *tbatpázou* byl poté elektroporován do WT hmyzí formy *T. brucei*.

Protein kódovaný *tbatpázou* není lokalizována v jádře ani mitochondrii (**Obr. 16**), výsledný signál pro TbATPázu byl následně porovnán s výsledky z článku od Price et al. (2007). Lokalizace TbATPázy byla poté navržena v ER. Kontrola při neinkubované primární protilátce byla úspěšná, neboť síla signálu pro sledovaný protein odpovídala síle signálu pozadí. (**Obr. 17**).

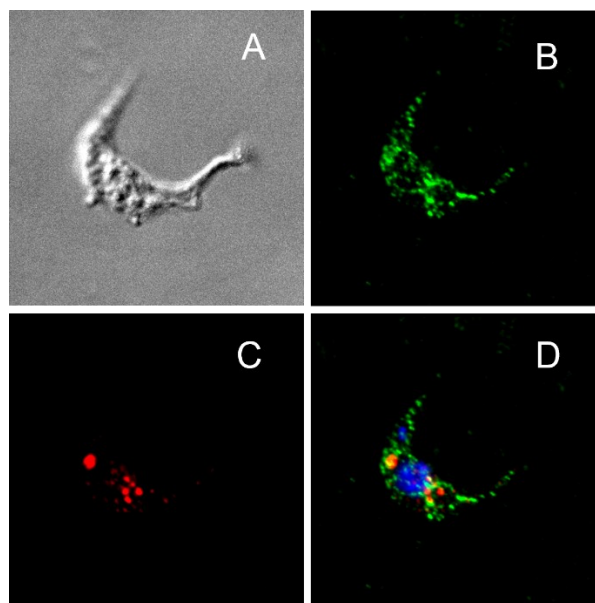


Obrázek 16. Výsledek fluorescenční mikroskopie při inkubaci s primární protilátkou proti V5 značce TbATPáze u *T. brucei*. **A**: buňka pozorována pomocí bright field, **B**: vizualizace TbATPázy pomocí V5 značky, **C**: barvivo MitoTracker fluorescenčně označující mitochondrii. **D**: sloučení kanálů B, C s DAPI, která fluorescenčně označuje jádro a kinetoplast.



Obrázek 17. Výsledek fluorescenční mikroskopie při absenci inkubace v primární protilátce proti V5 značce TbATPáze u *T. brucei*. **A**: buňka pozorována pomocí bright field, **B**: vizualizace TbATPázy pomocí V5 značky bez využití myší V5 protilátky, **C**: MitoTracker fluorescenčně označující mitochondrii, **D**: sloučení kanálů B, C s DAPI, která fluorescenčně označuje jádro a kinetoplast.

Dále. byl otestován možný překryv studovaného proteinu a králičí anti-BiP, avšak bez úspěchu (**Obr. 18**). Stejný výsledek byl zaznamenán při pokusu o kolokalizaci s myší anti-KDEL protilátkou. Proto byla lokalizace studovaného proteinu v ER vyloučena. Protílátka proti GA nebyla k dispozici.

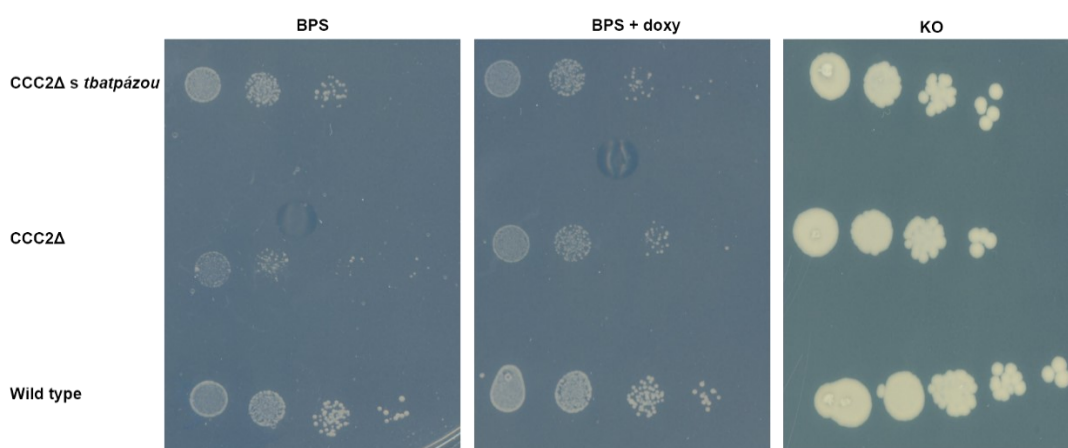


Obrázek 18. Výsledek fluorescenční mikroskopie kolokalizace ER s TbATPázou u *T. brucei*. **A**: buňka pozorována pomocí bright field, **B**: Vizualizace ER pomocí králičí anti-BiP protilátky **C**: vizualizace TbATPázy pomocí V5 značky, **D**: sloučení kanálů B, C s DAPI, která fluorescenčně označuje jádro a kinetoplast.

## 5.4 Charakterizace *tbatpázy*

Pomocí funkční komplementace byla snaha charakterizovat funkci TbATPázy. Gen kódující TbATPázu byl úspěšně zaklonován do plazmidu pCM189. Následně byla provedena transformace do *S. cerevisiae* u kmene WT a mutantního kmene CCC2Δ (ATPáza P1B typu přenášející měď). Po úspěšné transformaci byla provedena analýza funkce genu pomocí funkční komplementace.

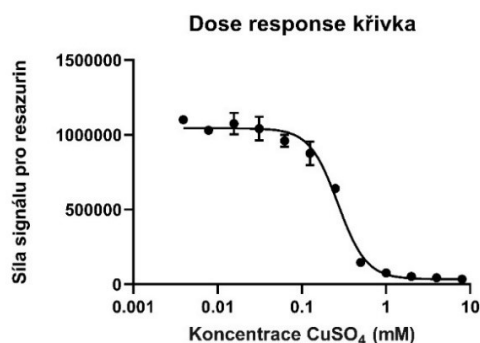
Bylo předpokládáno, že TbATPáza bude mít podobnou funkci jako CCC2. To bylo potvrzeno, jelikož byl zpozorován podobný nárůst u WT nesoucí prázdný pCM189 a kmene CCC2Δ nesoucí TbATPázu oproti nenarostlým kvasinkám kmene CCC2Δ nesoucí prázdný pCM189 na SC-U plotnách za přítomnosti BPS. Tím byla potvrzeno, že TbATPáza dokáže nahradit funkci CCC2 a dále určena její role v transportu mědi. Dále byla použita SC-U plotna s BPS přidáním doxycyklinem, čímž bylo zkontrolováno, že nárůst CCC2Δ závisel pouze na vloženém genu. Transkripce *tbatpázy* na plazmidu pCM189 je inhibována právě doxycyklinem. U mutantních linií byl růst za přítomnosti doxycyklinu limitován v podobné míře, nicméně oproti plotně bez doxycyklinu, byl nárůst kvasinek vyšší. Dále byl zaznamenán v rámci kontroly stejný nárůst u všech kvasinkových linií na SC-U plotně bez selekčních podmínek (**Obr. 19**).



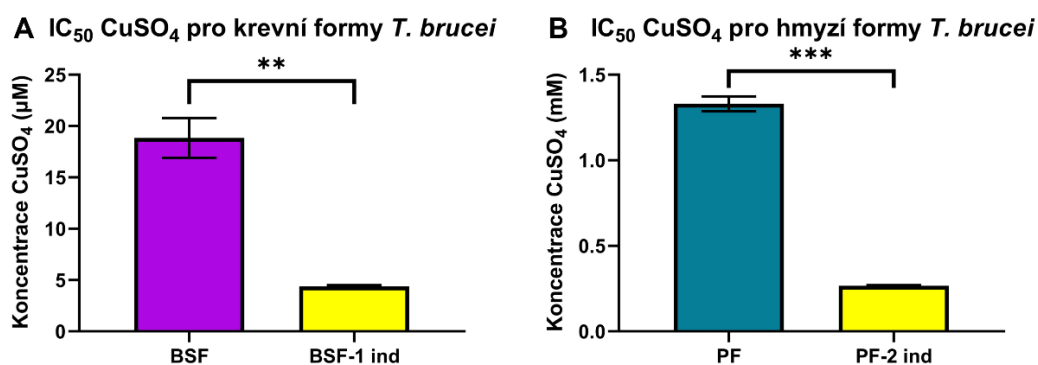
Obrázek 19. Výsledky funkční komplementace *tbatpázy* u *S. cerevisiae*. Na plotně bez uracilu (SC-U) s BPS nedokázaly narůst kvasinky mutantní pro *ccc2* (CCC2Δ) s prázdným plazmidem pCM189, zatímco CCC2Δ s vloženým plazmidem pCM189 nesoucím *tbatpázu* dokázali narůst podobně jako WT nesoucí prázdný plazmid pCM189. Dále byl podobně snížen nárůst mutovaných linií na SC-U plotně s BPS a doxycyklinem, leč byla předpokládána absence kolonií mutovaných kvasinek. Na SC-U plotně bez chelátoru a doxycyklinu narostli stejně všechny buněčné linie. ΔCCC2: mutantní kmen deficientní v ATPáze P1B typu CCC2; doxy: doxycyklin; KO; SC-U plotna bez BPS a doxycyklinu.

## 5.5 Stanovení míry toxicity u *T. brucei*

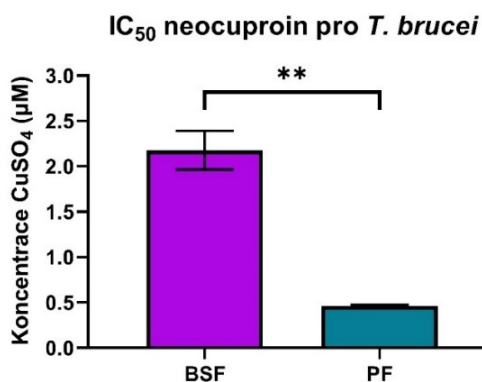
Úspěšně se podařilo stanovit míru toxicity mědi u *T. brucei* pomocí metody IC<sub>50</sub> u látek CuSO<sub>4</sub> a neocuprouinu. Vzorová dose response křivka je zobrazena v obrázku 20. Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> jsou zobrazeny v grafech uvedených v obrázcích 21 a 22.



Obrázek 20. Vzorová křivka dose response. Křivka popisuje vztah mezi koncentrací látky a počtem buněk, který je zde vyjádřen signálem barviva resazurinu.



Obrázek 21. Vyhodnocení  $IC_{50}$   $CuSO_4$  u *T. brucei* v biologickém triplikátu. kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou krevní (A) a hmyzí (B) formy má vyšší citlivost vůči mědi než WT *T. brucei*. Vzhledem k naměřeným hodnotám byla naznačena role TbATPázy při detoxifikaci mědi. BSF: WT krevní forma; BSF1-ind: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou; PF: WT hmyzí forma; PF2-I: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Statistika provedena pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.



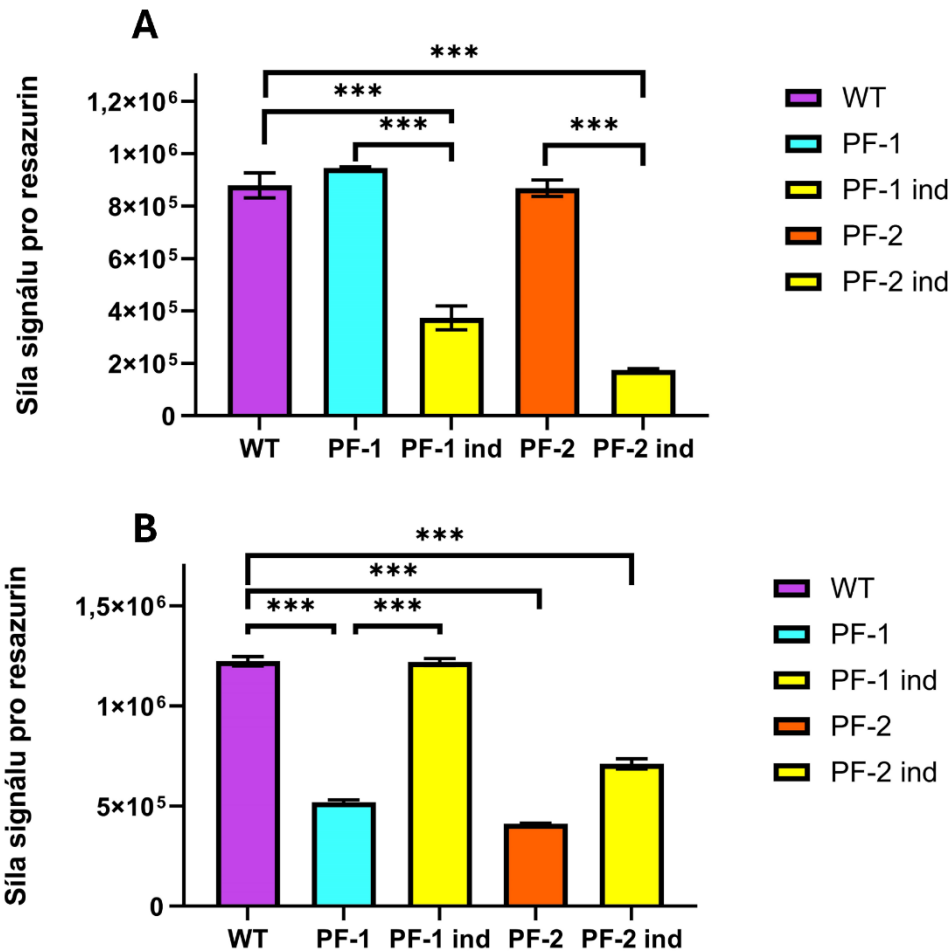
Obrázek 22. Vyhodnocení  $IC$  neocuproin pro WT krevní (BSF) a hmyzí formy (PF) *T. brucei* v biologickém triplikátu. WT hmyzí formy mají vyšší citlivost vůči snížené koncentraci mědi. BSF: WT krevní forma; PF: WT hmyzí forma; \*\* =  $p < 0,01$ . Statistika provedena pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

Data byla vyhodnocena Studentovým t-testem. Hodnoty p jsou zobrazeny a popsány v obrázcích 21 a 22. Ze získaných hodnot  $IC_{50}$  testovaných látek bylo zjištěna nižší citlivost vůči mědi u hmyzí formy než u krevní formy. Hodnota  $IC_{50}$   $CuSO_4$  byla stanovena pro hmyzí formu na  $1,33 \pm 0,13$  mM oproti krevní formě  $20,38 \pm 2,33$   $\mu$ M, při srovnání p hodnota vyšla  $<0,001$  (\*\*\*) . Výsledky dále naznačují, že měď je více potřebná pro metabolismus hmyzí formy, jelikož krevní formy dokázali narůst v prostředí o nižší koncentraci mědi. Hodnota  $IC_{50}$  neocuproin byla stanovena na  $2,18 \pm 0,11$   $\mu$ M pro krevní formu oproti hmyzí formě  $0,48 \pm 0,02$   $\mu$ M.

Dále bylo zjištěna vyšší citlivost vůči mědi u kmene  $\Delta tbatpáza$  *T. brucei* se sníženou TbATPázou ve srovnání s WT u hmyzích forem, neboť hodnota  $IC_{50}$   $CuSO_4$  byla stanovena na  $0,27 \pm 0,02$  mM oproti WT  $1,33 \pm 0,13$  mM a u krevních forem na  $4,42 \pm 0,28$   $\mu$ M oproti WT  $20,38 \pm 2,33$   $\mu$ M. Vzhledem k těmto výsledkům může TbATPáza hrát roli při detoxifikaci mědi.

## 5.6 Vliv TbATPázy na fenotyp *T. brucei*

Dále byl zkoumán fenotyp *T. brucei* při snížené expresi TbATPázy. V podmínkách o různé koncentraci mědi nebyl zaznamenán nárůst buněk buněčných linií krevních formy *T. brucei*. V podmínce o zvýšené koncentraci mědi (**Obr. 23A**) byl u hmyzí formy splněn předpoklad. U kmenů  $\Delta tbatpáza$  se sníženou TbATPázou byla zaznamenána výrazná inhibice růstu ve srovnání s WT a neindukovanými kmeny  $\Delta tbatpáza$ . V podmínce o snížené koncentraci mědi (**Obr. 23B**) byl zaznamenán podobný nárůst kmene  $\Delta tbatpáza$  se sníženou TbATPázou pomocí fragmentu 1 jako u WT. Naopak u kontrolních neindukovaných kmenů  $\Delta tbatpáza$  byla pozorována výrazná inhibice růstu oproti WT, přičemž byla předpokládána podobná rychlost množení. Výsledky jsou statisticky podpořeny pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Hodnoty p jsou zobrazeny a popsány v obrázku 23.



Obrázek 23. Vliv *TbATPázy* na fenotyp *T. brucei* při různých podmínkách v biologickém triplikátu. **(A)** U kmenů  $\Delta$ tbatpáza se sníženou *TbATPázou* byla ve srovnání s WT a neindukovanými kmeny  $\Delta$ tbatpáza zaznamenána výrazná inhibice růstu v podmínce o zvýšené koncentraci mědi. **(B)** V podmínce o nižší koncentraci mědi byl zaznamenán u kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou *TbATPázou* s fragmentem 1 podobný nárůst jako u WT. Naopak kontrolní skupiny, neindukované kmeny  $\Delta$ tbatpáza narostly výrazně hůře než WT, což nesplňuje předpoklad experimentu. \*\*\* =  $p < 0,001$ ; WT: wild type; PF-1: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 1; PF-1ind: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou *TbATPázou* pomocí fragmentu 1; PF-2: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2; PF-2ind: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou *TbATPázou* pomocí fragmentu 2. Statistika provedena pomocí analýzy jednocestné ANOVA a post-hoc Tukeyho testu. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

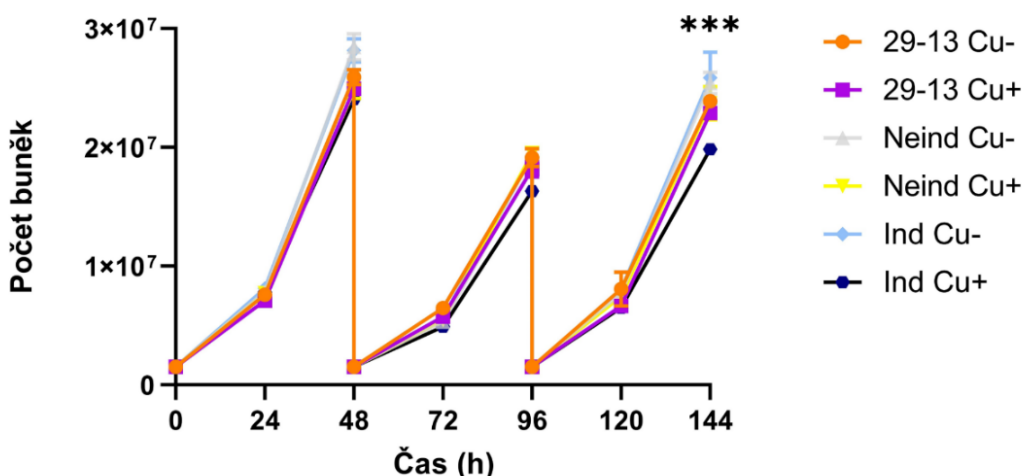
## 5.7 Růstová křivka

Stejně jako v kapitole 5.6 byl testován fenotyp *T. brucei* při snížené expresi *TbATPázy*, avšak zde byl měřen růst buněk pouze u hmyzí formy *T. brucei*, na základě výsledků 5.6, navíc v kultivačních lahvích, kde může být rychlost množení mírně odlišná ve srovnání s růstem v 96-jamkové destičce.



Z naměřených hodnot byl pro všechny skupiny v médiu o přidané mědi (Cu+) vypočítán „doubling time“, neboli doba, kdy se populace buněk zdvojnásobí mezi čtvrtým a šestým dnem měření. Poté byla provedena analýza jednocestné ANOVA a post hoc Dunnettův test. Rozdíl v růstu mezi kmenem  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou a skupinami WT a neindukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza v podmínce o zvýšené koncentraci mědi (Ind Cu+) byl určen jako statisticky signifikantní (Obr. 24). Společně s výsledky (5.5 a 5.6) byla naznačena funkce TbATPázy v detoxifikaci mědi.

**Růstová křivka při zvýšené koncentraci CuSO<sub>4</sub>**



Doubling time (h) ± SD			
29-13 Cu-	12,0 ± 0,08	29-13 Cu+	12,2 ± 0,11
Neind Cu-	11,8 ± 0,15	Neind Cu+	12,1 ± 0,25
Ind Cu-	11,7 ± 0,33	Ind Cu+	12,9 ± 0,13

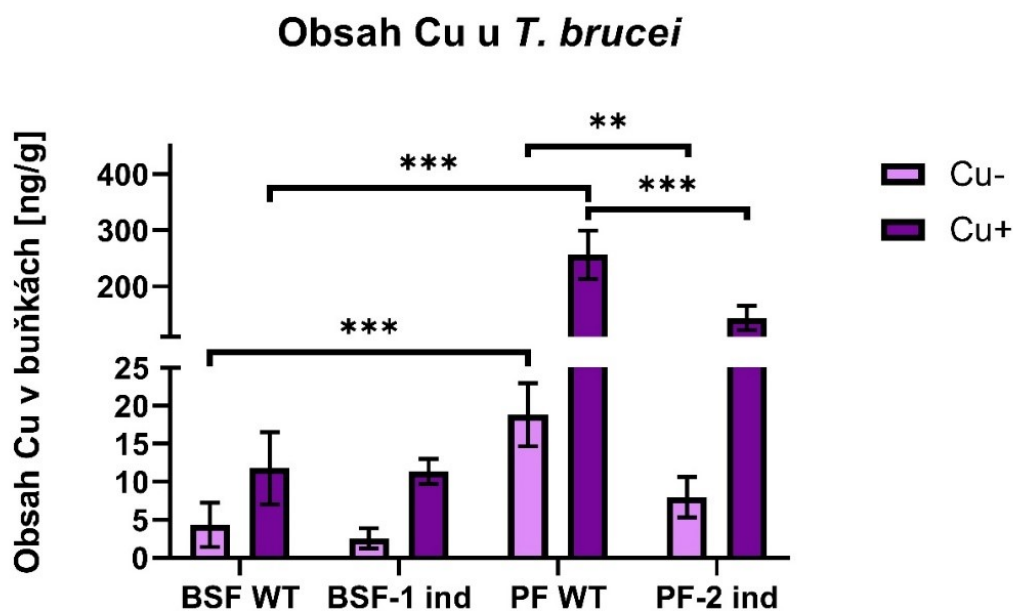
Obrázek 24. Růstové měření *T. brucei* při odlišných koncentracích mědi v biologickém tetraplikátu. U kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou byla zjištěna nižší rychlost růstu v podmínce o vyšší koncentraci mědi ve srovnání se skupinami WT a neindukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza pomocí stanovených hodnot doubling time neboli doby zdvojení buněk mezi čtvrtým a šestým dnem. Růstové měření *T. brucei* bylo provedeno při různých koncentracích mědi v biologickém tetraplikátu. U kmene  $\Delta$ tbatpáza, jež má sníženou TbATPázu, byla zaznamenána nižší rychlost růstu při vyšší koncentraci mědi ve srovnání se skupinami WT a neindukovaným kmenem  $\Delta$ tbatpáza. Výsledek byl určen na základě stanovených hodnot doubling time neboli doby zdvojení u testovaných buněk mezi čtvrtým a šestým dnem. SD: směrodatná odchylka; 29-13 Cu-: WT v médiu; Neind Cu-: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2 v médiu; Ind Cu-:  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou v médiu; 29-13 Cu+: WT v médiu se zvýšenou koncentrací mědi; Neind Cu+: neindukovaný kmen  $\Delta$ tbatpáza s fragmentem 2 v médiu se zvýšenou koncentrací mědi; Ind Cu+: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou v médiu se zvýšenou koncentrací mědi; Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

## 5.8 Výsledky ICP-MS.

Metodou ICP-MS bylo určena koncentrace mědi v dehydratovaných vzorcích hmyzí a krevní formy *T. brucei*. Pomocí analýzy jednocestné ANOVA a následného post hoc Tukeyho testu byla provedena statistika. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu mědi v ng na gram

sušiny (ng/g) u hmyzí formy *T. brucei* mezi WT a kmenem  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou v médiu ( $18,82 \pm 4,15$  oproti  $7,98 \pm 2,65$ ) a také v médiu o zvýšené koncentraci mědi ( $256,6 \pm 10,8$  oproti  $143,8 \pm 5,4$ ). Když se přidala měď do média, tak u kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou byl stanoven poměrově vyšší obsah mědi než u WT (18x oproti 13,6x). Stejný trend byl zjištěn u krevní formy (7,5x oproti 2,72x). Výsledky mohou naznačovat, že u kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou pravděpodobně dochází ke snížené aktivitě dráhy pro import mědi do buněk *T. brucei*, zároveň však importovaná měď není efektivně využita ve srovnání s WT a dochází k její vyšší akumulaci v buňce.

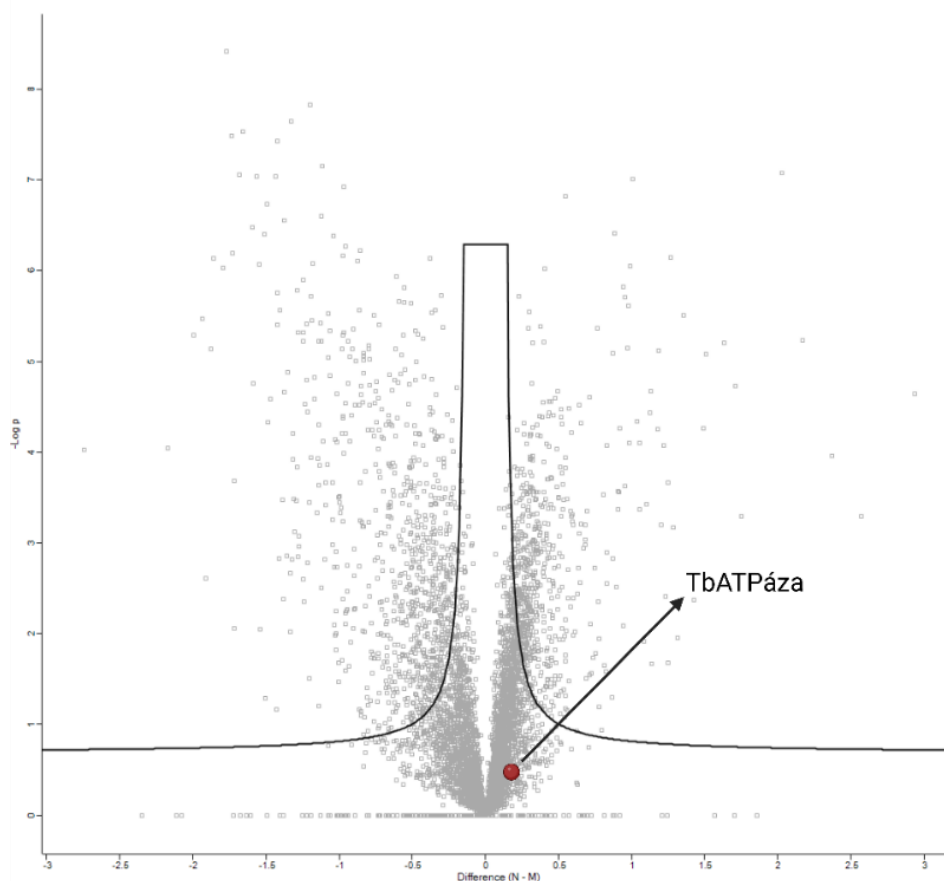
Dále byla stanovena statisticky významně vyšší obsah mědi (ng/g) u WT hmyzí formy ve srovnání s WT krevní formou v médiu ( $4,35 \pm 2,94$  oproti  $18,82 \pm 4,15$ ) a v médiu při zvýšené koncentraci mědi ( $256,6 \pm 10,8$  oproti  $13,9 \pm 0,9$ ) (**Obr. 25**). U hmyzí formy *T. brucei* je měď více potřebná v rámci jejího energetického metabolismu, naopak krevní forma by mohla měď efektivněji vylučovat ven z buňky nebo u ní mohlo dojít k inhibici dráhy pro import mědi.



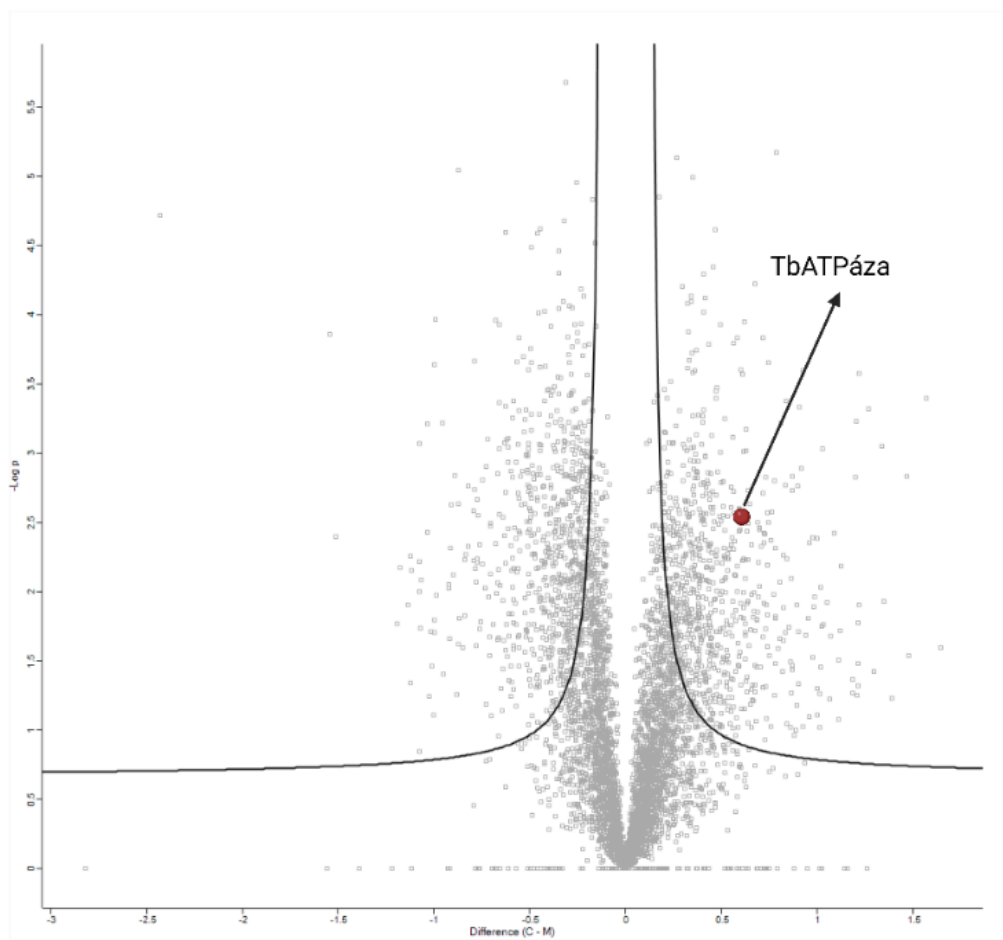
Obrázek 25. Stanovení obsahu mědi při různých podmínkách u *T. brucei* v biologickém tetraplikátu. U hmyzí formy byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi WT a kmenem  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou. Zároveň byl stanoven nižší poměrový nárůst mědi u WT (13,6x oproti 18x) při zvýšené koncentraci mědi v médiu. Výsledky poukazují na pravděpodobně sníženou aktivitu dráhy pro import mědi, ale zároveň nižší efektivitu zpracování mědi v buňce *T. brucei* kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou oproti WT, čímž dochází k vyšší akumulaci mědi v buňce. Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi WT krevní a hmyzí formou, naznačující vyšší potřebu mědi v metabolismu pro hmyzí formu *T. brucei*. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; BSF: WT krevní forma; BSF-ind: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou krevní forma; PF: WT hmyzí forma; PF-ind: kmen  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou hmyzí forma. Grafy jsou doplněny o chybové úsečky ve formě standardních odchylek.

## 5.9 Výsledky hmotnostní spektrometrie

V rámci hmotnostní spektrometrie byly porovnávány WT buňky krevní formy *T. brucei* inkubované při zvýšené a snížené koncentraci mědi s inkubovanými ve standardním médiu HMI-9. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo detekováno 5889 proteinů, z nichž 78 proteinů vykazovalo zvýšenou expresi a 156 proteinů sníženou expresi. Mezi detekovanými proteiny byla nalezena sledovaná TbATPáza. Exprese TbATPázy byla zvýšena při zvýšené koncentraci mědi 2,85x a při snížené koncentraci mědi 2,22x oproti expresi v HMI-9. Avšak nebyla zjištěna statická významnost. Výsledek naznačuje, že TbATPáza není regulována koncentrací mědi. Výsledek hmotnostní spektrometrie byl vizualizován pomocí volcano plotů (Obr. 26 a 27), získaných z laboratoře OMICS – proteomika (BIOCEV), které byly vytvořeny v programu Perseus. Jednotlivé body na volcano plotu označují nalezené proteiny. Vzdálenost od středu na ose x označuje změnu v expresi ( $\log_2$  fold change). Výška na ose y popisuje míru statistické významnosti ( $-\log p$ ). Detailnější analýza výsledků hmotnostní spektrometrie bude popsána v plánovaném článku.



Obrázek 26. Výsledek hmotnostní spektrometrie u krevní formy *T. brucei* v tetraplikátu vizualizován pomocí volcano plotu. Byly srovnávány vzorky v nižší koncentraci mědi s vzorky v médiu (N-M). Na obrázku nebyla u sledované TbATPáza zaznamenána významná změna v expresi. Vytvořeno v softwaru Perseus (DE), laboratoři OMICS – proteomika (BIOCEV) a dále upraveno v BioRender.com.



Obrázek 27. Výsledek hmotnostní spektrometrie u krevní formy *T. brucei* v tetraplikátu vizualizován pomocí volcano plotu. Byly srovnávány vzorky ve vyšší koncentraci mědi s vzorky v médiu (C-M). Na obrázku nebyla u sledované TbATPáza zaznamenána významná změna v expresi. Vytvořeno v softwaru Perseus, laboratoři OMICS – proteomika (BIOCEV) a dále upraveno v BioRender.com.

## 6 Diskuse

Měď je esenciální stopový prvek. Kvůli svým redoxním vlastnostem slouží jako kofaktor mnoha důležitých enzymů. Je součástí procesu oxidativní fosforylace, ochrany proti tvorbě kyslíkových radikálů a dále se významně podílí na příjmu železa (Besold et al. 2016). Volné ionty mědi se mohou nespecificky vázat na biomolekuly v buňce, příkladem mohou být lipoylované proteiny či Fe-S proteiny v mitochondrii. Vazba mědi na tyto proteiny způsobuje ztrátu jejich struktury a funkce. Tyto důsledky mohou vést až k buněčné smrti označované jako cuproptóza (Tsvetkov et al. 2022). Proto je hladina mědi v buňce silně regulována.

Měď je též důležitou součástí výbavy imunitního systému, během infekce je měď koncentrována ve fagolysozomech makrofágů k likvidaci patogenů, včetně parazitů. Odpovědí parazita bylo vyvinutí detoxifikačního systému mědi v buňce. Měď může vyloučit z buňky prostřednictvím ATPázy P1B typu nebo sekvestrovat pomocí metalothioneinů (Li et al. 2019).

Počet případů spavé nemoci způsobené poddruhy *T. brucei rhodesiense* a *gambiense* každoročně klesá, převážně díky užívání účinných léčiv fexinidazolu a nifurtimoxu a díky kvalitnímu kontrolnímu systému Světové zdravotnické organizace (WHO 2024). Avšak u zmíněných léčiv byla zaznamenána tvořící se rezistence (Wyllie et al. 2016). Léčiva obsahující měď by mohla představovat další možnost v boji proti *T. brucei*. Například u ionophorů byla prokázána antimikrobiální aktivita. (Grechnikova et al. 2020; Hesel et al 2017).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit nové poznatky o transportu mědi a její toxicitě u *T. brucei*. V rámci diplomové práce byla podrobena výzkumu ATPáza P1B typu u *T. brucei* (TbATPáza). TbATPáza je velká 95 kDa (Isah et al. 2020) oproti předpokládané velikosti 102 kDa z databáze TriTrypDB (Amos et al. 2022). Dále obsahuje 8 transmembránových domén, a 2 domény obsahující charakteristický motiv CXXC, jež váže měď (Boal a Rosenzweig 2009; Isah et al. 2020). Také byla srovnávána sekvence ATPázy P1B typu rodu *Trypanosoma* s jinými organismy, mezi které patřila i *S. cerevisiae*, která byla využita při funkční komplementaci TbATPázy. Při této analýze bylo zjištěno, že ATPázy P1B typu sdílejí aminokyselinové sekvence, které se podílejí na navázání a transportu mědi (Isah et al. 2020). Dále bylo zjištěno, že *T. brucei* neobsahuje žádný homolog proteinu Atx1 (Isah et al. 2020; Lin et al. 1997), který transportuje měď k CCC2 ani homolog proteinů rodiny CTR, které se podílejí na importu mědi (Dancis et al. 1994a; Grechnikova et al. 2024; Isah et al. 2020). Absence CTR byla též zjištěna u příbuzného rodu *Leishmania* (Grechnikova et al. 2024). CTR proteiny obsahují v rámci parazitických organismů například rody *Naegleria* spp. nebo *Plasmodium* spp., více v bioinformatické analýze (Grechnikova et al. 2024). I přes sdílenou absenci CTR mají rody *Trypanosoma brucei* a *Leishmania* odlišnou lokalizaci v savčím hostiteli. *Trypanosoma* se vyskytuje v savčím hostiteli extracelulárně zatímco *Leishmania* intracelulárně, z toho důvodu není předpokládán obdobný transport.

Příjem mědi by mohl být podobný příjmu železa. V krvi je železo součástí transferinu, který je přijímán *T. brucei* pomocí transferinového receptoru v periflagelární kapse (Steverding et al. 1995). Měď by mohla *T. brucei* přijímat z ceruloplasminu pomocí neznámého ceruloplasminového receptoru v periflagelární kapse (Isah et al. 2020). Ceruloplasmin by pak putoval ve váčcích ke kulovitým organelám (**Obr. 18D**), kde by byla měď z ceruloplasminu nejspíš redukována pomocí metaloreduktázy homologní Fre2 (Georgatsou et al. 1997) a poté přenesena na TbATPázu k dalšímu využití. V databázi TriTrypDB se vyskytují dva homology pro metaloreduktázu Fre2 u kmene 427 *T. brucei* (Tb427\_110049400.1-p1 a Tb427tmp.02.1990-t26\_1-p1) (Amos et al. 2022; The UniProt Consortium 2023).

Funkce TbATPázy byla potvrzena pomocí funkční komplementace u *S. cerevisiae*, kdy byl u kmene CCC2Δ *S. cerevisiae* s vloženou TbATPázou zpozorován růst při limitovaném množství železa (**Obr. 19**). Homologie pro CCC2 pomocí funkční komplementace byla též úspěšně potvrzena pro LmATP7 u *L. major* (Paul et al. 2021) naopak nebyla potvrzena pro ATPázu P1B typu (Nf-CuATPase) *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020). Na základě homologie k CCC2 byla predikována role TbATPázy v přenosu mědi *T. brucei*, přesná lokalizace by určila její konkrétní roli.

Kvůli čemuž byla vytvořena polyklonální protilátka z potkana proti TbATPáze za cílem stanovení míry exprese TbATPázy a určení její lokalizace (Kap. 5.1), avšak polyklonální protilátka se ukázala jako nefunkční. (**Obr. 13**). Polyklonální protilátka, specificky rozpoznává zkrácený úsek TbATPázy ve správné velikosti, nicméně na vzorcích lyzátů, membránových a cytosolických frakcích nikoliv. TbATPáza je nejspíš exprimována v buňce *T. brucei* v malém množství, kvůli čemuž nebyla detekována protilátkou. Nebo mohlo dojít během SDS-PAGE k zamotání proteinové struktury, čímž byla antigenní část protilátce zneprístupněna.

Z dat získaných z analýzy pomocí qPCR. byla určena vyšší exprese TbATPázy u krevní formy na transkripční úrovni ve srovnání s hmyzí formou *T. brucei*. Vyšší exprese TbATPázy, u krevní formy je pravděpodobně spojena s rolí TbATPázy při detoxifikaci mědi.

Lokalizace proteinu byla provedena pomocí exprese TbATPázy značené V5 (Kap. 5.3). Výsledek barevného signálu pro TbATPázu naznačoval lokalizaci proteinu v ER, když byl výsledek fluorescenční mikroskopie srovnán s výsledky od Price et al. (2007). Nicméně výskyt TbATPázy v ER byl vyloučen, jelikož TbATPáza nebyla kolokalizována s protilátkami myši anti-KDEL a králíčí anti-BiP. Při zvýšené expresi proteinu s V5 značkou pomocí T7 promotoru mohl být narušen transport značeného proteinu do cílového kompartmentu buňky, který se mohl projevit akumulací nezpracovaných a špatně složených proteinů v ER. Na základě fluorescenční mikroskopie (**Obr. 18D**) byla zpozorována lokalizace TbATPáza v kulovitých útvech. Tyto globule mohou připomínat Golgiho aparát (Ooi et al. 2018) nebo acidokalcisomy (Docampo et al. 2005). S ohledem k výsledkům funkční komplementace (Kap. 5.4) je předpokládáno, že měď je z trans-GA transportována TbATPázou do cílených proteinů, podobně jako CCC2 (Yuan et al. 1997). Navíc homologické ATPázy pro CCC2 u

*H. sapiens* se též vyskytují v trans-GA (Yamaguchi et al. 1996; Hung et al. 1997). Výskyt TbATPázy byl vyloučen v CM, ve které jsou lokalizovány ATPázy PIB-typu u několika parazitických organismů, mezi které patří *L. major* (Paul et al. 2021), *P. falciparum* (Choveaux et al. 2012), *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020) a *C. albicans* (Weissman et al. 2000). Využití protilátky proti markeru GA (GRASP) (Price et al. 2007) nebo proti markeru acidokalcisomu, (TbVP1) (Docampo et al. 2010) by mohlo určit přesnou lokalizaci TbATPázy u *T. brucei*.

V mitoproteomu hmyzí formy *T. brucei* je výrazně vyšší exprese proteinů, které jsou součástí klasického elektronového řetězce. Mezi tyto proteiny patří cytochromové komplexy III a IV s inkorporovanou mědí (Zíková et al. 2017). Proto se předpokládá, že krevní formy redukují kyslík za vzniku vody výrazně více pomocí TAO než pomocí cytochromových komplexů ve srovnání s hmyzí formou (Dejung et al. 2016; Gnipová et al. 2012; Zíková 2022), a měď bude z toho důvodu více potřebná pro hmyzí formu v metabolismu než pro krevní formu.

Hmyzí forma *T. brucei* má výrazně vyšší odolnost vůči mědi než krevní forma, protože byla stanovena více jak 60x vyšší hodnota IC<sub>50</sub> pro CuSO<sub>4</sub> (**Obr. 21**). Též bylo zjištěno, že krevní forma dokáže přežít při nižší koncentraci mědi, když byla stanovena vyšší hodnota IC<sub>50</sub> pro neocuproin u krevní formy (**Obr. 22**). Neocuproin by mohl posloužit jako potenciální léčivo v boji proti *T. brucei* u *Homo sapiens*. Na lidských buňkách byl *in vitro* testován při 100 μM koncentraci (Arnal et al. 2011), jedná se přibližně o 25x vyšší koncentraci neocuproinu než u krevních forem *T. brucei*. Nicméně bylo zjištěno, že se jedná o cytotoxickou látku, která je schopna vytvářet polychlorované fenoly (Zhu a Chevion 2000).

Ve srovnání s parazitem *L. major* vykazuje *T. brucei* odhadem 25x nižší citlivost k mědi. IC<sub>50</sub> CuSO<sub>4</sub> byla stanovena na 1,33 mM pro hmyzí formu *T. brucei*, zatímco podobná inhibice růstu byla sledována u promastigotů rodu *Leishmania* při 50 μM koncentraci CuSO<sub>4</sub>. Naznačující, že měď je více potřebná pro metabolismus u *T. brucei* (Paul et al. 2021).

Citlivost vůči mědi byla též stanovena pomocí metody IC<sub>50</sub> na 1,62 mM u patogenního druhu *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020), na 2,3 mM u patogenního druhu *Cryptococcus neoformans* (Ding et al. 2013) a na 10 mM u patogenního druhu *C. albicans* (Weissman et al. 2000). Dále byla stanovena u nepatogenních druhů na 1,05 mM u *N. gruberi* a 1,1 mM u *S. cerevisiae* (Grechnikova et al. 2020). Ze srovnání vyplývá, že patogenní organismy mají nižší citlivost vůči mědi, která nejspíš souvisí s efektivnějším detoxifikačním systémem. Dále byla zjištěna při srovnání IC<sub>50</sub> pro CuSO<sub>4</sub> výrazně vyšší citlivost k mědi u krevní formy *T. brucei*. Při srovnání s rody *Candida*, *Naegleria* a *Saccharomyces* byla u rodů *Trypanosoma* a *Leishmania* zjištěna absence proteinů podílejících se na detoxifikaci mědi (Grechnikova et al. 2024). Tyto poznatky naznačují, že by se zástupci třídy *Kinetoplastea* mohli stát ideálním cílem pro léčbu pomocí terapeutik obsahujících měď.

Ačkoliv snese hmyzí forma *T. brucei* vyšší koncentraci mědi, dokáže krevní forma nejspíš efektivněji regulovat příjem mědi nebo vylučovat její nadbytečné ionty, jelikož při podmínce o zvýšené koncentraci mědi byl u ní stanoven více než 10x nižší obsah mědi než u hmyzí formy *T. brucei*, avšak je též možné, že hmyzí forma vyžaduje více mědi v jejím metabolismu.

Pomocí metody inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  byla dále sledována vyšší citlivost k mědi u kmenů  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou ve srovnání s kmenem WT (**Obr. 21 a 22**). V podmínce o zvýšené koncentraci mědi by se mohla TbATPáza přemístit z trans-GA do váčků, kde by vyloučila měď z buňky podobně jako Menkeseho ATPáza, jenž je homologem CCC2 u *Homo sapiens* (Lutsenko a Petris 2003). Měď je detoxifikována ATPázami P1B typu u několika parazitických organismů, mezi něž patří *L. major* (Paul et al. 2021), *P. falciparum* (Rasoloson et al. 2004), *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020) a *C. albicans* (Weissman et al. 2000). Pro potvrzení role TbATPázy na detoxifikaci mědi by mohla být stanovena míra toxicity mědi u hmyzích buněk *T. brucei* se zvýšenou expresí značené TbATPázy. Snížená citlivost k mědi ve srovnání s kmenem WT by poukázala na účast TbATPázy při detoxikaci mědi. Dále byla zjištěna zvýšená exprese ATPázy P1B typu u parazitických organismů *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020), *C. albicans* (Mackie et al. 2016) a *L. major* (Paul et al. 2021) při zvýšené koncentraci mědi. Konkrétně byla zvýšena exprese ATPázy P1B typu v podmínce o vyšší koncentraci mědi 4,21x u *N. fowleri* (Grechnikova, 2020), u TbATPázy se nepotvrdila regulace exprese mědi. V budoucnu by mohla být zkoumána funkce TbATPázy testováním knock-out pro *tbatpazu* u *T. brucei*. Avšak knock-out se nepodařil u homologické LmATP7, která je nejspíš kódována esenciálním genem u *L. major* (Paul et al. 2021). Výsledky naznačují podobně jako ve studii Paul et al. 2021, že TbATPáza má dvojitou roli. Podílí se na transportu mědi v buňce a při zvýšené koncentraci mědi na její detoxifikaci.

Dále bylo předpokládáno, že pokud je TbATPáza využita *T. brucei* při detoxifikaci mědi, tak WT budou obsahovat méně mědi než kmen  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou. Podobného výsledku bylo dosaženo u LmATP7 (Paul et al. 2021). Avšak u hmyzí formy *T. brucei* nebyl tento výsledek potvrzen, při zvýšené koncentraci mědi byl změřen 1,8x vyšší obsah mědi u WT oproti kmenu  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou (**Obr. 25**). Nicméně v rámci ICP-MS byla přidána koncentrace mědi  $IC_{10}$  pro hmyzí kmen  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou, což nepředstavovalo nadbytek mědi pro WT a pouze mírný stres pro buňky se sníženou TbATPázou. Navíc při zvýšené koncentraci mědi byl u kmene  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou poměrově zvýšen obsah mědi oproti WT (7,5x oproti 2,72x u krevní formy a 18x oproti 13,6x). Výsledky ICP-MS naznačují, že u kmene  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou je nejspíš snížena aktivita dráhy pro import mědi a zároveň je pravděpodobné, že přijaté ionty mědi u kmene  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou jsou neúčinně zpracovány, což vede k vyšší akumulaci mědi. Zajímavé výsledky by mohla poskytnout hmotnostní spektrometrie. Pro původní záměr s cílem ověřit roli TbATPázy v detoxifikaci mědi by bylo pravděpodobně potřeba zvýšit koncentraci mědi, aby byla limitující pro kmen  $\Delta tbatp\acute{a}za$  se sníženou TbATPázou a WT buňky.

U *L. major* bylo u promastigotů určeno množství mědi v buňkách kolem 4 ng na milión buněk při inkubaci v médiu (Paul et al. 2021). U rodu *Trypanosoma* inkubovaných v médiu byl určen obsah mědi v buňce na 4,35 ng/g u buněk krevní formy a 18,82 ng/g u buněk hmyzí formy. Rozdíl v obsahu mědi mezi krevní a hmyzí formou byl určen jako statisticky významný. Tento výsledek naznačuje, že měď je u hmyzí formy *T. brucei* více využita v rámci jejího



metabolismu. Výrazně vyšší obsah mědi byl ve srovnání s hmyzí formou *T. brucei* stanoven na 84,1 mg/g u *N. fowleri* (Grechnikova et al. 2020). Jelikož byla u těchto rodů změřena podobná odolnost vůči mědi, může být předpokládána efektivnější regulace importu či vyšší export volných iontů mědi pomocí TbATPázy u rodu *Trypanosoma* ve srovnání s rodem *Naegleria*. Další možností může být výrazně vyšší obsah mědi v médiu u *Naegleria* než v médiu SDM-79.

Vliv TbATPázy na fenotyp *T. brucei* byl dále testován pomocí růstové křivky. Při měření růstové křivky po dobu 6 dnů došlo k statisticky významnému snížení inhibice růstu u kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou oproti WT a neindukovanému kmenu  $\Delta$ tbatpáza v médiu o zvýšené mědi (**Obrázek 24**). Společně s výsledky z kapitoly 5.5 je naznačena role TbATPázy při detoxifikaci mědi. Růstová křivka byla též provedena pro *L. major* (Paul et al. 2021). Ta probíhala po dobu 72 h, přičemž buňky byly inkubovány v médiu s přidanou mědi o koncentraci v rozmezí 0-500  $\mu$ M. Již při 50  $\mu$ M přidané koncentraci mědi byl sledována výrazná inhibice růstu. Při 200  $\mu$ M byl růst téměř potlačen.

V rámci dalšího testování vlivu TbATPázy na fenotyp *T. brucei* byly testovány buňky krevní a hmyzí formy *T. brucei* při různých podmínkách. Při podmínce o zvýšené koncentraci mědi byla zjištěna výrazná inhibice růstu u kmenů  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou, tím byla opět naznačena role TbATPázy v detoxifikaci mědi. Při snížené koncentraci mědi byl výrazně snížen růst u kontrolní skupiny, neindukovaných kmenů  $\Delta$ tbatpáza, naopak u kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou pomocí fragmentu 1 byl sledován růst srovnatelný s WT. Nárůst kmene  $\Delta$ tbatpáza se sníženou TbATPázou mohl být způsoben vysokou výchozí koncentrací mědi, kdy chelátor neocuproin mohl svou přítomností snížit toxické účinky mědi. Nicméně v tom případě by byl očekáván nárůst u všech sledovaných skupin a zároveň by byl výrazně inhibován růst u skupin v podmínce o zvýšené mědi.

V této studii byla navržena dvojitá role TbATPázy u *T. brucei*. TbATPáza se podílí na transportu mědi v buňce a na detoxifikaci mědi. Mechanismus importu mědi do *T. brucei* není znám, nicméně byl navržen design importu mědi analogický importu železa u *T. brucei*.

Při srovnání inhibičních hodnot pro  $\text{CuSO}_4$  u vybraných druhů parazitů, byla zjištěna poměrně vysoká citlivost k mědi u krevní formy *T. brucei* a promastigotů rodu *Leishmania* (Paul et al. 2021). Vzhledem k jejich zaznamenané rezistenci na používaná léčiva (Ponte-Sucre et al. 2017; Wyllie et al. 2016), by se proti nim a *T. cruzi* mohla vyvinout léčiva obsahující měď. Tato léčiva by mohla sloužit v boji proti spavé nemoci, leishmanióze a Chagasově chorobě. Mezi taková léčiva by mohly být zařazeny ionophory, lipofilní látky, které akumulují měď v buňce, čímž dochází k využití toxických vlastností mědi. Antimikrobiální aktivita ionophorů již byla zaznamenána u rodu *C. neoformans* (Helsel et al. 2017).

Celkově lze konstatovat, že role TbATPázy v metabolismu mědi u *T. brucei* je stále předmětem zkoumání. Je nezbytné provést další experimenty k lepšímu porozumění transportu mědi v *T. brucei*.

## 7 Závěr

Měď je esenciálním prvkem pro všechny aerobní organismy. Zároveň může přítomnost volných iontů mědi vést k buněčné smrti. V rámci diplomové práce byl zkoumán transport a testována míra toxicity mědi u *Trypanosoma brucei*, původce spavé nemoci a onemocnění nagana.

V této práci se podařilo charakterizovat přenašeč mědi na základě funkční komplementace. Jedná se o ATPázu PIB typu, která je funkčně homologická k CCC2 u *Saccharomyces cerevisiae*. TbATPáza se tedy podílí na transportu mědi v buňce *T. brucei*.

Další část diplomové práce se věnovala toxicitě mědi, kdy byla testována odolnost krevní a hmyzí formy *T. brucei* vůči mědi pomocí v podmínkách o zvýšené mědi. Byla naznačena další funkce TbATPázy v detoxifikaci mědi u *T. brucei*, jelikož u buněk se sníženou expresí TbATPázy byla určena vyšší citlivost k mědi než u wild type. TbATPáza nejspíš zastává v *T. brucei* dvojí roli. Zároveň se potvrdilo, že měď je efektivněji využita hmyzí formou, jelikož byl u ní stanoven vyšší obsah mědi ve srovnání s krevní formou *T. brucei*.

Sledovaný protein se nepodařilo kolokalizovat. Lokalizace TbATPázy byla zjištěna v kulovitých útvech v buňce *T. brucei*, které připomínají struktury acidokalcisomů a GA, avšak její přesná lokalizace je neznámá. V rámci dalších pokusů bychom se pokusili protein kolokalizovat s protilátkou proti GA a acidokalcisomu.

Dále byla určena vyšší exprese TbATPázy na transkripční úrovni u krevní formy oproti hmyzí formě *T. brucei*, přičemž její role je u krevní formy předpokládána zejména při detoxifikaci mědi *T. brucei*. Exprese TbATPázy není regulována mědí.

V budoucnosti by se mohla vyvíjet léčiva obsahující měď proti *Trypanosoma* spp. a *Leishmania* spp. U obou rodů *Leishmania* a *Trypanosoma* byla sledována vysoká citlivost k mědi ve srovnání s jinými parazitickými rody. Je důležité vytvořit novou variantu léčiv, jelikož časem si parazit proti terapeutikům vytváří rezistenci. Měď by se mohla stát součástí nových terapeutických postupů nebo léčiv proti spavé nemoci, leishmanióze nebo Chagasově chorobě.

## 8 Seznam použitých zkratk

ETR	Elektronový transportní řetězec
Cu/Zn SOD	Superoxid dismutáza obsahující zinek a měď
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
CTR	Copper transporter, přenašeč mědi
CcO	Cytochrom c oxidáza
CCC2	Copper transporting ATPase, měď přenášející ATPáza P1B typu v <i>S. cerevisiae</i>
TAO	Trypanosomální alternativní oxidáza
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
NDH2	Alternativní dehydrogenáza
PCR	Polymerázová řetězová reakce
BPS	Bathofenantrolin disulfonát
ROS	Reaktivní formy kyslíku
OD	Optická denzita
GA	Golgiho aparát
ER	Endoplazmatické retikulum
AVČR	Akademie věd České republiky
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
VSG	Variable surface glycoprotein, Variabilní povrchový glykoprotein
G-3-PD	Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
DHAP	Dihydroxyaceton
MELAS	Mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátová acidóza a záchvaty podobné mrtvici
CM	Cytoplazmatická membrána

## 9 Seznam použité literatury

ACESTOR, N., A. ZÍKOVÁ, R. A. DALLEY, A. ANUPAMA, A. K. PANIGRAHI a K. D. STUART, 2011. Trypanosoma brucei mitochondrial respiratome: composition and organization in procyclic form. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* [online]. **10**(9), M110.006908. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M110.006908

ALBERT, M. A., J. R. HAANSTRA, V. HANNAERT, J. VAN ROY, F. R. OPPERDOES, B. M. BAKKER a P. A. M. MICHELS, 2005. Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(31), 28306–28315. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M502403200

AMOS, B., C. AURRECOECHEA, M. BARBA, A. BARRETO, E. Y. BASENKO, W. BAŽANT, R. BELNAP, A. S. BLEVINS, U. BÖHME, J. BRESTELLI, B. P. BRUNK, M. CADDICK, D. CALLAN, L. CAMPBELL, M. B. CHRISTENSEN, G. K. CHRISTOPHIDES, K. CROUCH, K. DAVIS, J. DEBARRY, R. DOHERTY, Y. DUAN, M. DUNN, D. FALKE, S. FISHER, P. FLICEK, B. FOX, B. GAJRIA, G. I. GIRALDO-CALDERÓN, O. S. HARB, E. HARPER, C. HERTZ-FOWLER, M. J. HICKMAN, C. HOWINGTON, S. HU, J. HUMPHREY, J. IODICE, A. JONES, J. JUDKINS, S. A. KELLY, J. C. KISSINGER, D. K. KWON, K. LAMOUREUX, D. LAWSON, W. LI, K. LIES, D. LODHA, J. LONG, R. M. MACCALLUM, G. MASLEN, M. A. MCDOWELL, J. NABRZYSKI, D. S. ROOS, S. C. S. RUND, S. SCHULMAN, A. SHANMUGASUNDRAM, V. SITNIK, D. SPRUILL, D. STARNES, C. J. STOECKERT, S. S. TOMKO, H. WANG, S. WARRENFELTZ, R. WIECK, P. A. WILKINSON, L. XU a J. ZHENG, 2022. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research* [online]. **50**(D1), D898–D911. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab929

ANDREWS, N. C., 2001. Mining copper transport genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **98**(12), 6543–6545. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.131192498

ARGÜELLO, J. M., E. EREN a M. GONZÁLEZ-GUERRERO, 2007. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals* [online]. **20**(3–4), 233. ISSN 0966-0844, 1572-8773. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-006-9055-6

ARNAL, N., M. J. DE ALANIZ a C. A. MARRA, 2011. Carnosine and neocuproine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **192**(3), 257–263. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2011.03.017

BALSA, E., R. MARCO, E. PERALES-CLEMENTE, R. SZKLARCZYK, E. CALVO, M. O. LANDÁZURI a J. A. ENRÍQUEZ, 2012. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metabolism* [online]. **16**(3), 378–386. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2012.07.015

- BANCI, L., I. BERTINI, S. CIOFI-BAFFONI, T. KOZYREVA, K. ZOVO a P. PALUMAA, 2010. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature* [online]. **465**(7298), 645–648. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09018
- BESOLD, A. N., E. M. CULBERTSON a V. C. CULOTTA, 2016. The Yin and Yang of copper during infection. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. **21**(2), 137–144. ISSN 0949-8257, 1432-1327. Dostupné z: doi:10.1007/s00775-016-1335-1
- BÍLÝ, T., S. SHEIKH, A. MALLETT, P. BASTIN, D. PÉREZ-MORGA, J. LUKEŠ a H. HASHIMI, 2021. Ultrastructural Changes of the Mitochondrion During the Life Cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. **68**(3), e12846. ISSN 1066-5234, 1550-7408. Dostupné z: doi:10.1111/jeu.12846
- BIRBEN, E., U. M. SAHINER, C. SACKESEN, S. ERZURUM a O. KALAYCI, 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization J* [online]. **5**(1), 9–19. ISSN 19394551. Dostupné z: doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
- BOAL, A. K. a A. C. ROSENZWEIG, 2009. Structural biology of copper trafficking. *Chemical Reviews* [online]. **109**(10), 4760–4779. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr900104z
- BOCHUD-ALLEMANN, N. a A. SCHNEIDER, 2002. Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(36), 32849–32854. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M205776200
- BROWN, D. M., J. A. UPCROFT a P. UPCROFT, 1995. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **72**(1–2), 47–56. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(95)00065-9
- BRUN, R. a M. SCHÖNENBERGER, 1979. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta tropica* [online]. [vid. 2024-04-04]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Cultivation-and-in-vitro-cloning-or-procyclic-forms-Brun-Sch%C3%B6nenberger/61edf7dc100f325d5e1c8160b82d784769118795>
- BÜSCHER, P., G. CECCHI, V. JAMONNEAU a G. PRIOTTO, 2017. Human african trypanosomiasis. *The Lancet* [online]. **390**(10110), 2397–2409. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(17)31510-6
- BUTT, T. R., E. J. STERNBERG, J. A. GORMAN, P. CLARK, D. HAMER, M. ROSENBERG a S. T. CROOKE, 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **81**(11), 3332–3336. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.81.11.3332
- CALVO, J., H. JUNG a G. MELONI, 2017. Copper metallothioneins. *IUBMB Life* [online]. **69**(4), 236–245. ISSN 1521-6543, 1521-6551. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1618

COUSTOU, V., M. BIRAN, M. BRETON, F. GUEGAN, Loïc RIVIÈRE, N. PLAZOLLES, D. NOLAN, M. BARRETT, J. M. FRANCONI a F. BRINGAUD, 2008. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(24), 16342–16354. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M709592200

CULBERTSON, E. M., A. A. KHAN, A. MUCHENDITSI, S. LUTSENKO, D. J. SULLIVAN, M. J. PETRIS, B. P. CORMACK a V. C. CULOTTA, 2020. Changes in mammalian copper homeostasis during microbial infection. *Metallomics* [online]. **12**(3), 416–426. ISSN 1756-5901, 1756-591X. Dostupné z: doi:10.1039/c9mt00294d

DANCIS, A., D. HAILE, D. S. YUAN a R. D. KLAUSNER, 1994a. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **269**(41), 25660–25667. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)47300-0

DANCIS, A., D. S. YUAN, D. HAILE, C. ASKWITH, David EIDE, C. MOEHLE, J. KAPLAN a R. D. KLAUSNER, 1994b. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* [online]. **76**(2), 393–402. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(94)90345-X

DE DOMENICO, I., D. M. WARD, M. C. B. DI PATTI, S. Y. JEONG, S. DAVID, G. MUSCI a J. KAPLAN, 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *The EMBO Journal* [online]. **26**(12), 2823–2831. ISSN 0261-4189, 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601735

DEJUNG, M., I. SUBOTA, F. BUCERIUS, G. DINDAR, Anja FREIWALD, M. ENGSTLER, M. BOSCHART, F. BUTTER a C. J. JANZEN, 2016. Quantitative Proteomics Uncovers Novel Factors Involved in Developmental Differentiation of *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens* [online]. **12**(2), e1005439. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1005439

DIAZ, F., 2010. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. **1802**(1), Mitochondrial Dysfunction, 100–110. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2009.07.013

DING, C., R. A. FESTA, Y. L. CHEN, A. ESPART, Òscar PALACIOS, J. ESPÍN, M. CAPDEVILA, S. ATRIAN, J. HEITMAN a D. J. THIELE, 2013. *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. *Cell Host & Microbe* [online]. **13**(3), 265–276. ISSN 1934-6069. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2013.02.002

DOCAMPO, R., W. DE SOUZA, K. MIRANDA, P. ROHLOFF a S. N. J. MORENO, 2005. Acidocalcisomes ? Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **3**(3), 251–261. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1097

DOCAMPO, R., P. ULRICH a S. N. J. MORENO, 2010. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philosophical*

*Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **365**(1541), 775–784. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2009.0179

DOLEŽELOVÁ, E., M. KUNZOVÁ, M. DEJUNG, M. LEVIN, Brian PANICUCCI, C. REGNAULT, C. JANZEN, M. BARRETT, F. BUTTER a A. ZÍKOVÁ, 2020. Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of *Trypanosoma brucei*. *PLOS Biology* [online]. **18**(6), e3000741. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.3000741

DONELSON, J, 1998. Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **91**(1), 51–66. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-6851(97)00209-0

FANG, J. a D. S. BEATTIE, 2002. Novel FMN-Containing Rotenone-Insensitive NADH Dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* Mitochondria: Isolation and Characterization. *Biochemistry* [online]. **41**(9), 3065–3072. ISSN 0006-2960, 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/bi015989w

FLASPOHLER, J. A., B. C. JENSEN, T. SAVERIA, C. T. KIFER a M. PARSONS, 2010. A novel protein kinase localized to lipid droplets is required for droplet biogenesis in trypanosomes. *Eukaryotic Cell* [online]. **9**(11), 1702–1710. Dostupné z: doi:10.1128/ec.00106-10

FORNUSKOVA, D., L. STIBUREK, L. WENCHICH, K. VINSOVA, H. HANSIKOVA a J. ZEMAN, 2010. Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome *c* oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochemical Journal* [online]. **428**(3), 363–374. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20091714

GAWRYLUK, R. M. R., R. KAMIKAWA, C. W. STAIRS, J. D. SILBERMAN, M. W. BROWN a A. J. ROGER, 2016. The earliest stages of mitochondrial adaptation to low oxygen revealed in a novel rhizarian. *Current Biology* [online]. **26**(20), 2729–2738. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2016.08.025

GEORGATSOU, E., L. A. MAVROGIANNIS, G. S. FRAGIADAKIS a D. ALEXANDRAKI, 1997. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(21), 13786–13792. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.21.13786

GIETZ, R. D. a R. H. SCHIESTL, 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* [online]. **2**(1), 31–34. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.13

GNIPOVÁ, A., B. PANICUCCI, Z. PARIS, Z. VERNER, A. HORVÁTH, J. LUKEŠ a A. ZÍKOVÁ, 2012. Disparate phenotypic effects from the knockdown of various *Trypanosoma brucei* cytochrome *c* oxidase subunits. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **184**(2), 90–98. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2012.04.013

- GOLD, B., H. DENG, R. BRYK, D. VARGAS, D. ELIEZER, J. ROBERTS, X. JIANG a C. NATHAN, 2008. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nature Chemical Biology* [online]. **4**(10), 609–616. ISSN 1552-4450, 1552-4469. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.109
- GRECHNIKOVA, M., Z. FÜSSY a R. SUTAK, 2024. Copper in parasitic protists – a hitherto neglected virulence factor. *Trends in Parasitology* [online]. **40**(1), 5–9. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2023.10.003
- GRECHNIKOVA, M., K. ŽENÍŠKOVÁ, R. MALYCH, J. MACH a R. SUTAK, 2020. Copper detoxification machinery of the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* involves copper-translocating ATPase and the antioxidant system. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* [online]. **14**, 126–135. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2020.10.001
- HAINDRICH, A. C., V. ERNST, A. NAGULESWARAN, Q. F. OLIVERES, I. RODITI a D. RENTSCH, 2021. Nutrient availability regulates proline/alanine transporters in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **296**, 100566. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2021.100566
- HELFERT, S., A. M. ESTÉVEZ, B. BAKKER, P. MICHELS a C. CLAYTON, 2001. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*. **357**(Pt 1), 117–125. ISSN 0264-6021.
- HELLMAN, N. E. a J. D. GITLIN, 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* [online]. **22**(1), 439–458. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457
- HELSEL, M. E., E. J. WHITE, S. Z. A. RAZVI, B. ALIES a K. J. FRANZ, 2017. Chemical and functional properties of metal chelators that mobilize copper to elicit fungal killing of *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics: Integrated Biometal Science* [online]. **9**(1), 69–81. ISSN 1756-591X. Dostupné z: doi:10.1039/c6mt00172f
- HERZIG, S. a R. J. SHAW, 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **19**(2), 121–135. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm.2017.95
- HIRUMI, H. a K. HIRUMI, 1989. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *The Journal of Parasitology* [online]. **75**(6), 985–989. ISSN 0022-3395. Dostupné z: doi:10.2307/3282883
- HUNG, I. H., M. SUZUKI, Y. YAMAGUCHI, D. S. YUAN, R. D. KLAUSNER a J. D. GITLIN, 1997. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(34), 21461–21466. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.34.21461



- CHAN, H., V. BABAYAN, E. BLYUMIN, C. GANDHI, Kunal HAK, D. HARAKE, K. KUMAR, P. LEE, T. T. LI, H. Y. LIU, T. C. T. LO, C. J. MEYER, S. STANFORD, K. S. ZAMORA a M. H. SAIER JR., 2010. The p-type ATPase superfamily. *Microbial Physiology* [online]. **19**(1–2), 5–104. ISSN 2673-1665, 2673-1673. Dostupné z: doi:10.1159/000319588
- CHAUDHURI, M., R. D. OTT a G. C. HILL, 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology* [online]. **22**(10), 484–491. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2006.08.007
- CHEN, L., J. MIN a F. WANG, 2022. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. **7**(1), 378. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-022-01229-y
- CHEN, X., Q. P. DOU, J. LIU a D. TANG, 2021. Targeting ubiquitin–proteasome system with copper complexes for cancer therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. **8**, 649151. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2021.649151
- CHOVEAUX, D. L., J. M. PRZYBORSKI a J. P. D. GOLDRING, 2012. A Plasmodium falciparum copper-binding membrane protein with copper transport motifs. *Malaria Journal* [online]. **11**(1), 397. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2875-11-397
- INESI, G., R. PILANKATTA a F. TADINI-BUONINSEGNI, 2014. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochemical Journal* [online]. **463**(2), 167–176. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20140741
- ISAH, M. B., J. P. D. GOLDRING a T. H. T. COETZER, 2020. Expression and copper binding properties of the N-terminal domain of copper P-type ATPases of African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **235**, 111245. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2019.111245
- JOHNSTON, K., D. H. KIM, E. J. KERKHOVEN, R. BURCHMORE, M. P. BARRETT a F. ACHCAR, 2019. Mapping the metabolism of five amino acids in bloodstream form *Trypanosoma brucei* using U-13C-labelled substrates and LC–MS. *Bioscience Reports* [online]. **39**(5), BSR20181601. ISSN 0144-8463, 1573-4935. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20181601
- JOMOVA, K., D. VONDRAKOVA, M. LAWSON a M. VALKO, 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. **345**(1–2), 91–104. ISSN 0300-8177, 1573-4919. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-010-0563-x
- KAIM, W. a J. RALL, 1996. Copper a “modern” bioelement. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. **35**(1), 43–60. ISSN 0570-0833, 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.199600431
- KARGBO, A., G. EBILOMA, Y. K. IBRAHIM, G. D. CHECHET, M. JENG a E. O. BALOGUN, 2022. Epizootiology and molecular identification of trypanosome species in

- livestock ruminants in The Gambia. *Acta Parasitologica* [online]. **67**(1), 130–142. ISSN 1896-1851. Dostupné z: doi:10.1007/s11686-021-00442-z
- KAWAKAMI, M., R. INAGAWA, T. HOSOKAWA, T. SAITO a M. KURASAKI, 2008. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **46**(6), 2157–2164. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2008.02.014
- KNIGHT, S. A., S. LABBÉ, L. F. KWON, D. J. KOSMAN a D. J. THIELE, 1996. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes & Development* [online]. **10**(15), 1917–1929. ISSN 0890-9369, 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.10.15.1917
- LABBÉ, S., M. M. O. PEÑA, A. R. FERNANDES a D. J. THIELE, 1999. A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(51), 36252–36260. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.51.36252
- LI, C., Y. LI a C. DING, 2019. The role of copper homeostasis at the host-pathogen axis: from bacteria to fungi. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(1), 175. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20010175
- LIANG, Q. a B. ZHOU, 2007. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **18**(12), 4741–4749. ISSN 1059-1524, 1939-4586. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e07-05-0431
- LIN, S. J., R. A. PUF AHL, A. DANCIS, T. V. O'HALLORAN a V. C. CULOTTA, 1997. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(14), 9215–9220. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.14.9215
- LUTSENKO, S. a M. J. PETRIS, 2003. Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches. *Journal of Membrane Biology* [online]. **191**(1), 1–12. ISSN 0022-2631, 1432-1424. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-002-1040-6
- MACKIE, J., E. K. SZABO, D. S. URGAST, E. R. BALLOU, D. S. CHILDERS, D. M. MACCALLUM, J. FELDMANN a A. J. P. BROWN, 2016. Host-Imposed Copper Poisoning Impacts Fungal Micronutrient Acquisition during Systemic *Candida albicans* Infections. *PLOS ONE* [online]. **11**(6), e0158683. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0158683
- MACOMBER, L. a J. A. IMLAY, 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **106**(20), 8344–8349. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0812808106

MANTILLA, B. S., L. MARCHESE, A. CASAS-SÁNCHEZ, N. A. DYER, N. EJEH, M. BIRAN, F. BRINGAUD, M. J. LEHANE, A. ACOSTA-SERRANO a A. M. SILBER, 2017. Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei brucei* Survival in the Tsetse Vector. *PLOS Pathogens* [online]. **13**(1), e1006158. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1006158

MAZET, M., P. MORAND, M. BIRAN, G. BOUYSSOU, P. COURTOIS, S. DAULOUÈDE, Y. MILLERIOUX, J. M. FRANCONI, P. VINCENDEAU, P. MOREAU a F. BRINGAUD, 2013. Revisiting the Central Metabolism of the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the Mitochondrion Is Essential for Parasite Viability. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [online]. **7**(12), e2587. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0002587

MILLERIOUX, Y., C. EBIKEME, M. BIRAN, P. MORAND, Guillaume BOUYSSOU, I. M. VINCENT, M. MAZET, L. RIVIERE, J. M. FRANCONI, R. J. S. BURCHMORE, P. MOREAU, M. P. BARRETT a F. BRINGAUD, 2013. The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. *Molecular Microbiology* [online]. **90**(1), 114–129. ISSN 0950-382X, 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.12351

MORENO, C., A. TEMPORÃO, T. TORRES a M. SOUSA SILVA, 2019. *Trypanosoma brucei* Interaction with Host: Mechanism of VSG Release as Target for Drug Discovery for African Trypanosomiasis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(6), 1484. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20061484

MULLER, M., 1993. The Hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* [online]. **139**, 2879–2889. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-139-12-2879

MURDOCH, C. C. a E. P. SKAAR, 2022. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **20**(11), 657–670. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-022-00745-6

NOLAN, D. P. a H. P. VOORHEIS, 1992. The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase. *European Journal of Biochemistry* [online]. **209**(1), 207–216. ISSN 0014-2956, 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17278.x

NYIMBA, P. H., E. V. G. KOMBA, C. SUGIMOTO a B. NAMANGALA, 2015. Prevalence and species distribution of caprine trypanosomosis in Sinazongwe and Kalomo districts of Zambia. *Veterinary Parasitology* [online]. **210**(3), 125–130. ISSN 0304-4017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2015.04.003

OKADO-MATSUMOTO, A. a I. FRIDOVICH, 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(42), 38388–38393. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M105395200

- OOI, C. P., T. K. SMITH, E. GLUENZ, N. V. WAND, S. VAUGHAN a G RUDENKO, 2018. Blocking variant surface glycoprotein synthesis alters endoplasmic reticulum exit sites/Golgi homeostasis in *Trypanosoma brucei*. *Traffic* [online]. **19**(6), 391–405. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12561
- OPPERDOES, F. R. a P. BORST, 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* [online]. **80**(2), 360–364. ISSN 0014-5793, 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(77)80476-6
- OSAKI, S., D. A. JOHNSON. a E. FRIEDEN, 1966. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **241**(12), 2746–2751. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)96527-0
- OZAWA, T. a A. HANAKI, 1991. The first ESR spin-trapping evidence for the formation of hydroxyl radical from the reaction of copper(II) complex with hydrogen peroxide in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* [online]. (5), 330. ISSN 0022-4936. Dostupné z: doi:10.1039/c39910000330
- PAES, L. S., B. SUÁREZ MANTILLA, F. M. ZIMBRES, E. M. F. PRAL, Patrícia DIOGO DE MELO, E. B. TAHARA, A. J. KOWALTOWSKI, M. C. ELIAS a A. M. SILBER, 2013. Proline Dehydrogenase Regulates Redox State and Respiratory Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLOS ONE* [online]. **8**(7), e69419. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069419
- PAUL, R., S. BANERJEE, S. SEN, P. DUBEY, S. MAJI, A. K BACHHAWAT, R. DATTA a A. GUPTA, 2021. *The novel leishmanial Copper P-type ATPase plays a vital role in intracellular parasite survival* [online]. 1. leden 2021. [vid. 2024-04-03]. Dostupné z: doi:10.1101/2021.01.01.425060
- PETRIS, M. J., J. F. MERCER, J. G. CULVENOR, P. LOCKHART, P. A. GLEESON a J. CAMAKARIS, 1996. Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *The EMBO Journal* [online]. **15**(22), 6084–6095. ISSN 02614189. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00997.x
- PINGER, J., S. CHOWDHURY a F. N. PAPAVALIIOU, 2017. Variant surface glycoprotein density defines an immune evasion threshold for African trypanosomes undergoing antigenic variation. *Nature Communications* [online]. **8**(1), 828. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00959-w
- PONTE-SUCRE, A., F. GAMARRO, J. C. DUJARDIN, M. P. BARRETT, R. LÓPEZ-VÉLEZ, R. GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. W. POUNTAIN, R. MWENECHANYA a B. PAPADOPOULOU, 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st

century challenge. *PLOS neglected tropical diseases* [online]. **11**(12), e0006052. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0006052

POPOVIC, D. M., I. V. LEONTYEV, D. G. BEECH a A. A. STUCHEBRUKHOV, 2010. Similarity of cytochrome c oxidases in different organisms. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. **78**(12), 2691–2698. ISSN 1097-0134. Dostupné z: doi:10.1002/prot.22783

PRICE, Helen P., Meg STARK a Deborah F. SMITH, 2007. Trypanosoma brucei ARF1 plays a central role in endocytosis and Golgi–lysosome trafficking. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **18**(3), 864–873. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e06-08-0736

RASOLOSON, D., L. SHI, C. R. CHONG, B. F. KAFSACK a D. J. SULLIVAN, 2004. Copper pathways in Plasmodium falciparum infected erythrocytes indicate an efflux role for the copper P-ATPase. *The Biochemical Journal* [online]. **381**(Pt 3), 803–811. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20040335

REN, F., B. L. LOGEMAN, X. ZHANG, Y. LIU, D. J. THIELE a P. YUAN, 2019. X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nature Communications* [online]. **10**(1), 1386. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-09376-7

RENSING, C., B. FAN, R. SHARMA, B. MITRA a B. P. ROSEN, 2000. CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **97**(2), 652–656. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.2.652

RIVIÈRE, L., P. MOREAU, S. ALLMANN, M. HAHN, M. BIRAN, N. PLAZOLLES, J. M. FRANCONI, M. BOSHART a F. BRINGAUD, 2009. Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **106**(31), 12694–12699. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0903355106

ROSENZWEIG, A. C., 2001. Copper delivery by metallochaperone proteins. *Accounts of Chemical Research* [online]. **34**(2), 119–128. ISSN 0001-4842, 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar000012p

RYLEY, J. F., 1956. Studies on the metabolism of the Protozoa. 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of trypanosome. *The Biochemical Journal* [online]. **62**(2), 215–222. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj0620215

SERRANO, R., D. BERNAL, E. SIMÓN a J. ARIÑO, 2004. Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast Saccharomyces cerevisiae in an alkaline environment. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(19), 19698–19704. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M313746200

SHI, H., Y. JIANG, Y. YANG, Y. PENG a C. LI, 2021. Copper metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: an update. *BioMetals* [online]. **34**(1), 3–14. ISSN 0966-0844, 1572-8773. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-020-00264-y

SHINZAWA-ITOH, K., T. SUGIMURA, T. MISAKI, Y. TADEHARA, S. YAMAMOTO, M. HANADA, N. YANO, T. NAKAGAWA, S. UENE, T. YAMADA, H. AOYAMA, E. YAMASHITA, T. TSUKIHARA, S. YOSHIKAWA a K. MURAMOTO, 2019. Monomeric structure of an active form of bovine cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **116**(40), 19945–19951. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1907183116

SCHEIBER, I., R. DRINGEN a J. F. B. MERCER, 2013. Copper: effects of deficiency and overload. In: A. SIGEL, H. SIGEL a R. K.O. SIGEL, ed. *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, Metal Ions in Life Sciences, s. 359–387 [vid. 2022-11-05]. ISBN 978-94-007-7500-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7500-8\_11

SCHINDELIN, J., I. ARGANDA-CARRERAS, E. FRISE, V. KAYNIG, Mark LONGAIR, T. PIETZSCH, S. PREIBISCH, C. RUEDEN, S. SAALFELD, B. SCHMID, J. Y. TINEVEZ, D. J. WHITE, V. HARTENSTEIN, K. ELICEIRI, P. TOMANCAK a A. CARDONA, 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* [online]. **9**(7), 676–682. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.2019

SOLIOZ, M. a A. ODERMATT, 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(16), 9217–9221. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.16.9217

STEVERDING, D., 2017. Sleeping Sickness and Nagana Disease Caused by *Trypanosoma brucei*. In: C. B. MARCONDES, ed. *Arthropod Borne Diseases* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 277–297 [vid. 2024-04-03]. ISBN 978-3-319-13883-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-13884-8\_18

STEVERDING, D., Y. D. STIERHOF, H. FUCHS, R. TAUBER a P. OVERATH, 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of cell biology* [online]. **131**(5), 1173–1182. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.131.5.1173

SURVE, S., M. HEESTAND, B. PANICUCCI, A. SCHNAUFER a M. PARSONS, 2012. Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Eukaryotic Cell* [online]. **11**(2), 183–193. ISSN 1535-9778, 1535-9786. Dostupné z: doi:10.1128/EC.05282-11

SURVE, S. V., B. C. JENSEN, M. HEESTAND, M. MAZET, Terry K. SMITH, F. BRINGAUD, M. PARSONS a A. SCHNAUFER, 2017. NADH dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* is important for efficient acetate production in bloodstream forms.

*Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **211**, 57–61. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2016.10.001

ŠTÁFKOVÁ, J., J. MACH, M. BIRAN, Z. VERNER, F. BRINGAUD a J. TACHEZY, 2016. Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology* [online]. **100**(3), 442–456. ISSN 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.13325

THE UNIPROT CONSORTIUM, 2023. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* [online]. **51**(D1), D523–D531. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkac1052

TOH, J. Y., A. NKOUAWA, S. R. SÁNCHEZ, H. SHI, N. G. KOLEV a C. TSCHUDI, 2021. Identification of positive and negative regulators in the stepwise developmental progression towards infectivity in *Trypanosoma brucei*. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 5755. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-85225-2

TSVETKOV, P., S. COY, B. PETROVA, M. DREISHPOON, Ana VERMA, M. ABDUSAMAD, J. ROSSEN, L. JOESCH-COHEN, R. HUMEIDI, R. D. SPANGLER, J. K. EATON, E. FRENKEL, M. KOCAK, S. M. CORSELLO, S. LUTSENKO, N. KANAREK, S. SANTAGATA a T. R. GOLUB, 2022. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science* [online]. **375**(6586), 1254–1261. Dostupné z: doi:10.1126/science.abf0529

VERNER, Z., P. ČERMÁKOVÁ, I. ŠKODOVÁ, E. KRIEHOVÁ, A. HORVÁTH a J. LUKEŠ, 2011. Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is active in but non-essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **175**(2), 196–200. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.003

VERNER, Z., I. ŠKODOVÁ, S. POLÁKOVÁ, V. ĎURIŠOVÁ-BENKOVIČOVÁ, A. HORVÁTH a J. LUKEŠ, 2013. Alternative NADH dehydrogenase (NDH2): intermembrane-space-facing counterpart of mitochondrial complex I in the procyclic *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* [online]. **140**(3), 328–337. ISSN 0031-1820, 1469-8161. Dostupné z: doi:10.1017/S003118201200162X

WEISSMAN, Z., I. BERDICEVSKY, B. Z. CAVARI a D. KORNITZER, 2000. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **97**(7), 3520–3525. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.7.3520

WHO, 2024. *Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)* [online] [vid. 2024-04-03]. Dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))

WICKSTEAD, B., K. ERSFELD a K. GULL, 2002. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **125**(1–2), 211–216. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-6851(02)00238-4

- WYLLIE, S., B. J. FOTH, A. KELNER, A. Y. SOKOLOVA, M. BERRIMAN a A. H. FAIRLAMB, 2016. Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **71**(3), 625–634. ISSN 0305-7453, 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkv376
- YAMAGUCHI, Y., M. E. HEINY, M. SUZUKI a J. D. GITLIN, 1996. Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **93**(24), 14030–14035. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.24.14030
- YUAN, D. S., A. DANCIS a R. D. KLAUSNER, 1997. Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(41), 25787–25793. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.41.25787
- ZHU, B. Z. a M. CHEVION, 2000. Copper-mediated toxicity of 2, 4, 5-trichlorophenol: biphasic effect of the copper (I)-specific chelator neocuproine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **380**(2), 267–273. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.2000.1919
- ZÍKOVÁ, A., 2022. Mitochondrial adaptations throughout the *Trypanosoma brucei* life cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [online]. **69**(6), e12911. ISSN 1066-5234, 1550-7408. Dostupné z: doi:10.1111/jeu.12911
- ZÍKOVÁ, A., A. SCHNAUFER, R. A. DALLEY, A. K. PANIGRAHI a K. D. STUART, 2009. The F0F1-ATP Synthase Complex Contains Novel Subunits and Is Essential for Procytic *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens* [online]. **5**(5), e1000436. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1000436
- ZÍKOVÁ, A., Z. VERNER, A. NENAROKOVA, P. A. M. MICHELS a J. LUKEŠ, 2017. A paradigm shift: The mitoproteomes of procyclic and bloodstream *Trypanosoma brucei* are comparably complex. *PLOS Pathogens* [online]. **13**(12), e1006679. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1006679