

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KARLOVA
PRAHA



METABOLISMUS ŽELEZA U BUŇEK TRICHOMONÁD

Mgr. Pavel Suchan

Školitel: Doc. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Oddělení Parazitologie, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Viničná
7, 128 44, Praha 2

Abstrakt dizertační práce:

Úvod:

Železo je prvek, který je naprosto nezbytný pro většinu organismů. Buňky využívají tento kov především pro aktivitu proteinů účastnících se transportu elektronů a oxidoredukčních reakcí, které vyžadují tvorbu volných radikálů. Naproti tomu volné železo, tj. železo, které není specificky vázáno, je pro buňky vysoce toxické. Oxidoredukční reakce železa jsou totiž zdrojem vysoce reaktivních volných radikálů, které mohou ve tkáních katalyzovat autooxidační procesy. Organismy proto udržují velmi nízkou vnitřní hladinu volného železa, a to okolo 10^{-18} M. Toho je docíleno zejména díky souhře tří proteinů: (1) laktoferinu, který železo specificky vyvazuje; (2) transferinu, transportujícího železo mezi tkáněmi; (3) feritinu, který slouží pro intracelulární ukládání tohoto kovu.

Udržování nízké hladiny volného železa v tělních tekutinách pomocí specifické vazby na proteiny zároveň umožňuje obranu vyšších organismů proti mikrobiálním infekcím (tzv. nutriční imunitu). Pro hostitele mohou být totiž patogenní pouze mikroorganismy, které se naučily využívat i takto specificky vázané železo. Bakterie uplatňují při získávání hostitelova železa několik různých mechanismů jako je např. schopnost syntetizovat siderofory, nízkomolekulární ligandy, které díky své vysoké afinitě k železu tento kov hostiteli odebírají. Dalším mechanismem je exprese povrchových receptorů, které vážou železo přímo z transferinu, laktoferinu, hemoglobinu a dalších hostitelských proteinů vázajících železo. U některých mikroorganismů byla také pozorována schopnost snižovat pH a oxidoredukční potenciál ve svém okolí, což vede ke spontánnímu uvolnění železa z různých ligandů a tudíž i ke snadnější asimilaci tohoto kovu.

Mechanismy, které se uplatňují při získávání železa u parazitických prvoků nebyly doposud zcela objasněny. Ačkoliv bylo prokázáno, že anaerobní prvoci, jako např. trichomonády, giardie a *Entamoeba histolytica* mají extrémně vysoké nutriční nároky na železo, specifické receptory pro hostitelské proteiny vázající železo se doposud podařilo detekovat a částečně charakterizovat pouze u šesti druhů prvoků. Geny, kódující tyto receptory, byly identifikovány a analyzovány pouze v případě receptoru pro transferin u *Trypanosoma brucei*. Rovněž neexistují žádné informace o mechanismech uplatňujících se při následném intracelulárním transportu železa a další inkorporaci do buněčných organel a cílových molekul prvoků.

Důvodem vysokých nároků anaerobních prvoků na železo je pravděpodobně klíčová funkce železo-sírných proteinů v energetickém metabolismu, který je u trichomonád koncentrován do hydrogenozómů, organel sloužících k syntéze ATP za anaerobních podmínek.

Nejvýznamnějšími zástupci trichomonád jsou *Tritrichomonas foetus*, původce sexuálně přenosného onemocnění dobytka a *Trichomonas vaginalis*, způsobující pohlavně přenosné onemocnění člověka, kteří parazitují v urogenitální soustavě svých hostitelů. Zdrojem železa v těle hostitele může být pro oba prvoky laktoferin, který je přítomný ve vaginálních sekretech. Buňky *T. vaginalis* jsou schopny využívat také železo uvolněné z erytrocytů, které aktivně lyzují. *T. foetus*, parazitující především v uteru hostitele, může využívat pro příjem železa také transferin. Buňky *T. foetus* byly nalezeny také v zadní části zažívacího traktu, a proto by tento prvok mohl získávat železo i z nízkomolekulárních komplexů přítomných ve střevním obsahu. Vzhledem k vysokým nutričním nárokům trichomonád na železo, mnoha zdrojům, které mohou tyto prvoci pro příjem železa využívat a přítomnosti hydrogenozómů, jejichž funkce plně závisí na aktivitě Fe-S

proteinů, jsou trichomonády velmi atraktivním experimentálním modelem pro výzkum příjmu a metabolismu železa.

Cíle práce:

- prostudovat schopnost buněk *Tritrichomonas foetus* a buněk ostatních anaerobních prvoků získávat železo z různých zdrojů (laktoferin, transferin, nízkomolekulární komplexy železa)
- objasnit mechanismy uplatňující se při přijímání železa z laktoferinu, transferinu a nízkomolekulárních komplexů železa buňkami *Tritrichomonas foetus*
- identifikovat hlavní buněčné kompartmenty a cílové molekuly inkorporující železo v buňkách *Tritrichomonas foetus*
- zjistit, zda schopnost *Tritrichomonas foetus* získávat železo může modulovat virulenci tohoto parazita

Shrnutí výsledků:

1. Studované buňky anaerobních prvoků byly schopny akumulovat různé množství železa z laktoferinu, transferinu i z nízkomolekulárních komplexů. Pokusy zaměřené na stimulaci růstu parazitů a na vnitrobuněčnou inkorporaci železa ukázaly, že buňky *Tritrichomonas foetus* mohou využívat železo ze všech tří jmenovaných zdrojů, zatímco *G. intestinalis* a *E. histolytica* mohou pokrývat své nutriční požadavky výlučně železem vázaném v nízkomolekulárních komplexech, jako je např. železo-nitritotriacetátová kyselina (Fe-NTA). Rozdílná míra využívání železa z různých zdrojů může odrážet odlišnou lokalizaci parazitů v jejich hostitelích. Zatímco buňky *T. foetus* mohou kolonizovat všechny části reprodukčního traktu, které jsou bohaté zejména na laktoferin a transferin a byly také nalezeny v trávicím traktu, buňky *G. intestinalis* a *E. histolytica* parazitují pouze v trávicím traktu obsahujícím nízkomolekulární komplexy železa.

2. Buňky *T. foetus* přijímají železo z laktoferinu pomocí receptory zprostředkované endocytózy. Na povrchu buněk *T. foetus* bylo zjištěno okolo 1.7×10^5 vazebných míst specifických pro laktoferin ($K_d \cong 3.6 \mu\text{M}$). Komplex receptor-hololaktoferin je v prvním kroku pohlcován endocytózou a železo je poté uvolňováno v kyselém prostředí endozómu. Laktoferin bez železa je pak recyklován. Proteolytické štěpení laktoferinu vedoucí k uvolnění železa nebylo na rozdíl od savčích buněk u trichomonád pozorováno.

3. Buňky *T. foetus* přijímají železo z transferinu pomocí mechanismu, který je nezávislý na specifických povrchových receptorech. Ještě před transportem do buňky je železo uvolňováno z transferinu v kyselém prostředí vytvářeném trichomonádami vně buňky a také pomocí extracelulární redukce trojmocného na dvojmocné železo. Redukce je zprostředkována ferrireduktázovou aktivitou závislou na NADH a extracelulární sekrecí nízkomolekulárních redukčních faktorů. Redukované dvojmocné železo je následovně doprovováno do buňky pomocí mechanismu založeném na specifických membránových přenašečích. Železo vázané v nízkomolekulárních komplexech, jako např. Fe-NTA, je pravděpodobně přijímáno stejným mechanismem založeným na redukci železa vně buňky a jeho přenosu za použití specifického mechanismu zprostředkovaného nosiči.

4. Při studiu inkorporace železa do kompartmentů buněk *T. foetus* byly z buněk značených železem ^{59}Fe pomocí diferenciální centrifugace a následného dělení na gradientu percollu izolovány buněčné frakce. Hydrogenozómy zastupovaly pouze jeden z klíčových oddílů, do nichž bylo železo inkorporováno. Tyto

organely jsou schopny účinně akumulovat železo během krátkých inkubací s nízkomolekulárním komplexem Fe-NTA (360.4 pmol Fe / hodinu / mg proteinu). Analýza pomocí atomové absorpční spektrofotometrie, stanovující rovnovážnou hladinu železa následně po dlouhodobé inkubaci v komplexním médiu, odhalila v hydrogenozómech *T. foetus* neobvykle vysokou koncentraci železa (54.4 nmol Fe / mg proteinu). Pomocí nativní gradientové elektroforézy a následné detekce a analýzy radioaktivity metodou „storage phosphoimaging“ bylo objeveno nejméně devět molekul, do nichž bylo železo inkorporováno. Analýza aminokyselinové sekvence N- konce proteinu a následná sekvenace celého genu prokázala, že hlavní složka vázající železo, pojmenovaná „pruh H-I“, je ve skutečnosti feredoxin adrenodoxinového typu. Velké množství feredoxinu v hydrogenozómech naznačuje, že vedle účasti tohoto proteinu při přenosu elektronů může feredoxin hrát také důležitou roli v pochodech souvisejících s metabolismem železa.

5. Přestože je rovnovážná hladina železa v cytosolu *T. foetus* čtyřikrát nižší (13.4 nmol Fe / mg proteinu) než v hydrogenozómech, tento kompartment vykazuje porovnatelnou míru akumulace železa během krátkodobé inkubace s nízkomolekulárními komplexy železa jako je Fe-NTA (304.7 pmol Fe / hodinu / mg proteinu). Analýza pomocí nativní gradientové polyakrylamidové elektroforézy odhalila, že tzv. LIP (“labile iron pool”) je hlavní složkou vázající železo v cytosolu. Bylo prokázáno, že železo přítomné v této složce je chelatovatelné silnými chelátory jako je desferrioxamine. Pokusy s ultrafiltrací naznačily, že se většina LIP skládá z molekul, jejichž velikost odpovídá rozmezí 5-30 kDa. LIP je podstatně více přítomen u trichomonád a buněk dalších anaerobních prvoků než u savčích buněk. Vysoký nadbytek labilního železa u anaerobních prvoků může odrážet nepřítomnost feritinu a lze předpokládat, že LIP slouží jako rezervoár pro skladování železa v buňkách anaerobních prvoků. Kromě LIP bylo u *T. foetus* objeveno dalších pět složek vázajících železo s kinetikou odpovídající konečným příjemcům tohoto kovu.

6. Mechanismus získávání železa od hostitele hraje důležitou roli ve virulenci *Trichomonas foetus*. Kmen *T. foetus* KV-1, u kterého byla prokázána snížená schopnost získávat železo z nízkomolekulárních komplexů a transferinu, vykazuje nižší virulenci při infekci myšího modelu (~5% hladina úmrtnosti) v porovnání s kmenem LUB-1 MIP (~80% úmrtnost). To ukazuje na lepší schopnost získávat železo z obou zmiňovaných zdrojů. Zvýšení dostupnosti železa v hostitelském prostředí pomocí intraperitoneální injekce nízkomolekulárních komplexů železa jako je citronan železito-amonný do myši vede ke zvýšení virulence kmene KV-1 na hladinu porovnatelnou s kmenem LUB-1 MIP.