

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Důležitost dimerů F_0F_1 ATP syntázy pro krevní formu savčího
parazita *Trypanosoma brucei***

Bakalářská práce

Monika Čížková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Alena Panicucci Zíková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Bibliografická citace

Čížková M. (2023). Důležitost dimerů F_0F_1 ATP syntázy pro krevní formu savčího parazita *Trypanosoma brucei* [Importance of F_0F_1 ATP synthase dimers for blood stream form mammals parasite *Trypanosoma brucei*. Bc. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace

Mitochondrial F_0F_1 -ATP synthase is a molecular machine that generates ATP in a process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). Its dimers are crucial factors for mitochondrial cristae biogenesis. The importance of this complex for both processes, mitochondrial ultrastructure and OXPHOS, makes it difficult to decipher the specific effects of dimer loss. Here, I took advantage of the bloodstream form *Trypanosoma brucei*, which does not use OXPHOS for ATP generation, to investigate the role of ATP synthase dimers in mitochondrial biogenesis. I generated a knock-out cell line in which the absence of the ATP synthase subunit g results in the complex being present only as a monomer. I have verified the generated mutant cell line by PCR and detected the expected loss of dimers by native electrophoresis. The generated mutant cell line will be an excellent tool to study the role of ATP synthase dimers in bloodstream parasites and their differentiation into OXPHOS-competent insect forms.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v referencích

V Českých Budějovicích dne 10. 4. 2023

.....
Monika Čížková

Poděkování

Mé poděkování patří především doc. RNDr. Alče Zíkové, Ph.D. za možnost vypracovat bakalářskou práci na toto téma. Možnost práce na tomto tématu mi dala hrozně moc a za to jsem Alče nesmírně vděčná. Také ji děkuji za velmi vstřícné a odborné vedení. Velké díky náleží Mgr. Míše Husové, za její pomoc, bez které bych nebyla schopna tuto práci vypracovat a děkuji především za trpělivost, se kterou mi pomáhala, ač věřím, že občas ji bylo potřeba víc než dost. Také musím poděkovat celému AZ týmu za vytvoření milého prostředí, ve kterém jsem měla šanci pracovat a tím poznat, co obnáší opravdová práce vědce. Mým rodičům, rodině a přátelům děkuji za podporu a za to, že to se mnou nevzdali.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	<i>ATP syntáza</i>	1
1.1.1.	Mitochondriální ATP syntáza.....	2
1.1.1.1.	Syntéza ATP.....	3
1.1.1.2.	Hydrolyza ATP pomocí F_0F_1 ATP syntázy.....	5
1.1.1.3.	Ohýbání vnitřní mitochondriální membrány.....	5
1.1.1.4.	Dimerizace ATP syntázy.....	7
1.2.	<i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.2.1.	Životní cyklus <i>T. brucei</i>	10
1.2.2.	Dimerizace u <i>T. brucei</i>	12
1.2.3.	Diferenciace mezi BSF a PCF <i>T. brucei</i> in vitro.....	13
2.	Cíle práce.....	15
3.	Metody	16
3.1.	<i>Molekulární klonování</i>	16
3.1.1.	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR).....	16
3.1.2.	Gelová elektroforéza a izolace DNA z agarózového gelu.....	18
3.1.3.	Klonování 5'UTR a 3'UTR PCR produktu do plasmidů pLEW13 a pLEW90.....	19
3.1.3.1.	Restrikce PCR produktu pomocí enzymů a příprava sKO a dKO kazety.....	20
3.1.3.2.	Ligace.....	20
3.1.3.3.	Transformace do bakterií.....	20
3.1.3.4.	Izolace plasmidové DNA z bakterií a ověření správnosti klonování pomocí restrikční reakce a sekvenování.....	21
3.2.	Kultivace buněk <i>T. brucei</i>	21
3.2.1.	Měření buněk.....	21
3.2.2.	Vytvoření stabilátů vytvořených linií.....	22
3.3.	<i>Transfekce genetických modifikací do T. brucei</i>	22
3.3.1.	Příprava linearizované DNA.....	22
3.3.2.	Transfekce.....	23
3.3.3.	Selekce pomocí antibiotik.....	23
3.4.	<i>SDS–polyakrylamid gelová elektroforéza (SDS-PAGE)</i>	24
3.4.1.	Příprava buněčného lyzátu.....	24
3.4.2.	SDS-PAGE.....	24
3.4.3.	Přenos proteinů na membránu.....	25
3.5.	<i>Izolace mitochondrií pomocí hypotonické lýze</i>	26
3.6.	<i>Lýze mitochondrií a určení koncentrace proteinů</i>	27
3.7.	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	27
3.7.1.	Přenos proteinů na membránu.....	28
3.8.	Prokazování přítomnosti proteinu na PVDF membráně pomocí protilátek.....	29
3.9.	<i>Alamar blue assay</i>	30
4.	Výsledky.....	32

4.1.	<i>Příprava DNA kazety pro delecí první alely genu pro podjednotku g.....</i>	32
4.2.	<i>Příprava DNA kazety pro delecí druhé alely genu pro podjednotku g.....</i>	34
4.3.	<i>Úspěšné vytvoření dKO linií pro podjednotku g z WT buněk T. brucei</i>	35
4.4.	<i>Ztráta podjednotky g nemá vliv na růst BSF T. brucei.....</i>	38
4.5.	<i>Ztráta dimerů způsobena absencí podjednotky g byla ověřena v nativním gelu.....</i>	40
4.6.	<i>Ztráta podjednotky g nemá vliv na stacionární hladinu dalších podjednotek F_oF₁ ATP syntázy</i>	41
4.7.	<i>U linií s absencí podjednotky g nebyla pozorována snížená tolerance na oligomycin</i>	44
5.	Diskuze	45
6.	Závěr.....	48
7.	Reference.....	49

1. Úvod

1.1. ATP syntáza

Zdrojem veškeré energie pro buňku je adenosintrifosfát (ATP). Skládá se ze tří fosfátů, spojených fosfoanhydridovou vazbou, hydrolýza třetího fosfátu způsobí uvolnění značného množství energie za vzniku adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu (Pi) (Khakh et al, 2009).

Klíčovou roli v tvorbě ATP hraje proteinový komplex F-type adenosintrifosfát syntáza (ATP syntáza, F-ATPáza, F_1F_o -ATPáza), který se nachází na vnitřní membráně mitochondrií, chloroplastů a v plazmatické membráně bakterií, archeí a cyanobakterií (Arnold et al, 1998). ATP syntáza bývá označována jako makromolekulární turbína, která je schopná syntetizovat ATP z ADP a Pi pomocí rotace (Walker, 2013). ATP syntáza syntetizuje ATP pouze v tzv. přímém režimu (forward mode), také může pracovat v tzv. obráceném režimu (reverse mode), kdy je ATP hydrolyzováno (Cotter et al, 2003).

Mezi všemi typy ATP syntázy platí určitý podobný „stavební plán“. Vždy se jedná o proteinový komplex o velikost 550 – 1600 kDa, jenž se skládá celkem ze dvou základních částí, sférické F_1 jednotky (hlavy) a F_o jednotky. Jednotka F_1 je složena ze tří α a tří β podjednotek. Tyto podjednotky zprostředkovávají syntézu nebo hydrolýzu ATP. Jednotka F_o je v režimu syntézy původcem točivého momentu a v případě hydrolýzy pumpuje protony přes membránu. Jednotka F_o obsahuje podjednotku a a tzv. c-kroužek, u kterého se počet dalších podjednotek c pohybuje mezi 8 a 17. Obě jednotky jsou spolu propojeny dvěma stopkami, centrální a periferní. Centrální přenáší točivý moment mezi jednotkami. Periferní stopka brání rotaci hlavy, aby mohlo docházet pouze ke konformačním změnám jejích podjednotek, a ne k celkové rotaci (Kühlbrandt, 2019).

S ohledem na vysokou konzervovanost této struktury se v chloroplastech struktura ATP syntázy příliš neodlišuje. U rostlin se ATP syntáza nachází v chloroplastech na tylakoidních membránách. Protonový gradient je vytvářen pomocí procesu fotosyntézy. Základní odlišnost se nachází u c-kroužku, kde u mitochondriální ATP syntázy nalézáme pouze 8 – 10 podjednotek c-kroužku, tak v chloroplastu se jich vyskytuje až 14, což má za následek, že

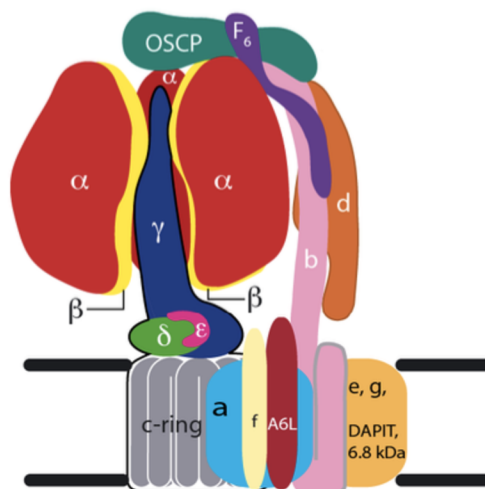
k tvorbě jedné molekuly ATP je třeba více protonů, než ve srovnání například se savčí mitochondriální ATP syntázou, která má c podjednotek jen 8 (Nelson et al, 2004).

U bakterií, jejichž ATP syntáza byla díky *Escherichii coli* (*E. coli*) prozkoumána nejvíce, se také nachází velmi podobná struktura. Ovšem, oproti mitochondriální, je částečně jednodušší. F_0 jednotka sestává z podjednotek a, b a c, kdy podjednotka c se také seskupuje do c-kroužku. F_1 jednotka má o jednu podjednotku méně, ale jinak se neodlišuje. Centrální stopka se skládá z podjednotky γ a ϵ , periferní sestává pouze z podjednotek b a δ . Základní rozdíl se nachází především v tom, že bakteriální ATP syntáza může pracovat i obráceně, tedy využívat hydrolýzu ATP k vytvoření protonového gradientu. Proces syntézy a hydrolýzy ATP může bakterie libovolně měnit v závislosti na prostředí, ve kterém se bakterie právě nachází (Sobti et al, 2016).

1.1.1. Mitochondriální ATP syntáza

Mitochondrie bývá často označována jako „elektrárna buňky“ (powerhouse of the cell). Toto označení si vysloužila díky tomu, že na své vnitřní membráně nese veškeré ATP syntázy, které buňka má (Javadov et al, 2013).

Savčí mitochondriální ATP syntáza se základní organizací příliš neodlišuje od toho, které je společné všem druhům ATP syntázy. Periferní stopka, která bývá považována za součást jednotky F_0 , se v mitochondriální ATP syntáze skládá z několika dalších podjednotek, konkrétně b, d, F_6 a proteinu senzitivního na oligomycin (Oligomycin sensitivity-conferring protein, OSCP), které spojují jednotky F_1 a F_0 a tím zabraňují rotaci jednotky F_1 . Také se zde nacházejí podjednotky e, a, f, g, DAPITA, 6,8 kDa a A6L zvětšující jednotku F_0 (Obr. 1) (Neupane et al, 2019).



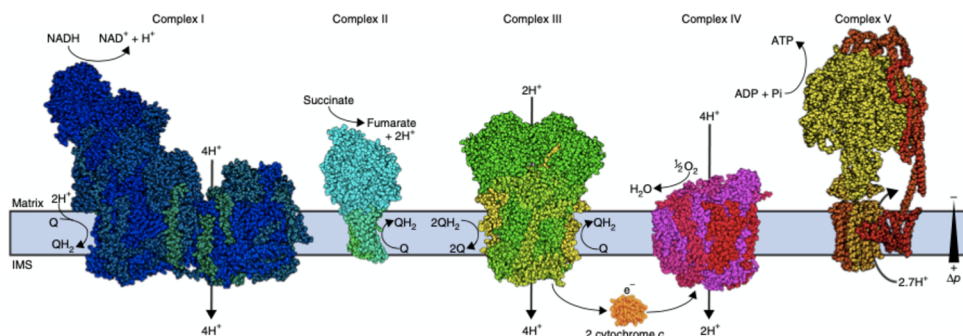
Obrázek 1: Mitochondriální savčí ATP syntáza s vyznačenými podjednotkami. Lze vidět základní složení jednotky F_1 ze 3 podjednotek α (červeně) a 3 podjednotek β (žlutě v zákrytu červených podjednotek α). F_1 je s F_0 spojena centrální stopkou, tvořenou podjednotkou γ , δ a ϵ . Jednotka F_0 je tvořena c-kroužkem, podjednotkou a a dalšími, pro savčí mitochondrii specifickými, podjednotkami (f, A6L, e, g, DAPITA, 6,8 kDa). Periferní stopka, také tvořena specifickými podjednotkami (b, d, F_6 a OSCP), spojuje obě jednotky (F_1 a F_0) a zabraňuje rotaci F_1 jednotky (Neupane et al, 2019).

1.1.1.1. Syntéza ATP

Oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation, OXPHOS) je proces, během kterého se vyrábí ATP oxidativním metabolismem například glukózy. Tento typ metabolismu začíná procesem glykolýzy v cytoplazmě, kde je glukóza přeměněna na pyruvát. Pyruvát je pak dále v mitochondriích dekarboxylován na acetylkoenzym A, který vstupuje do citrátového cyklu, kde je oxidován a zároveň jsou vytvořeny redukované molekuly nikotinamidadeninukleotid (NADH) a flavinadeninukleotid ($FADH_2$). Tyto molekuly se stávají přenašeči elektronů, jenž jsou následně využity elektrontransportním řetězcem (electron transport chain, ETC). ETC se skládá ze 4 proteinových komplexů (CI – CIV) zanořených v mitochondriální membráně, jejichž funkcí je přenášet elektrony od přenašečů (NADH, $FADH_2$) na kyslík, který slouží jako univerzální příjemce. Během přenosu elektronů přes komplexy dochází k uvolnění značné

energie, která je využita na přenos protonů z jedné strany mitochondriální membrány na druhou. Tím dochází ke vzniku elektrochemického protonového gradientu (Δp), který je následně využit ATP syntázou (Birsoy et al, 2015, Letts et al, 2017). Δp se u mitochondrií skládá ze dvou složek. Jedná se o rozdíl pH (ΔpH) a elektrogenní rozdíl v náboji (mitochondriální membránový potenciál, $\Delta\Psi_m$), který vytváří pro buňku důležitý membránový potenciál. Hodnoty Δp se pohybují v rozmezí 150-180 mV (Nicholls et al, 2000).

Ač se ETC skládá celkem ze 4 komplexů, tak na přímém přenosu protonů se podílejí pouze 3 z nich a to NADH-ubiquinon oxidoreduktáza (komplex I, CI), ubiquinol-cytochrom c oxidoreduktáza (komplex III, CIII) a cytochrom c oxidáza (komplex IV, CIV). Komplex II (CII), sukcinát-ubiquinon oxidoreduktáza, nepřenáší protony z jedné strany mitochondriální membrány na druhou, ale ke vzniku Δp přispívá přeměnou sukcinátu na fumarát (Obr. 2) (Letts et al, 2017).



Obrázek 2: Model zobrazující ETC v mitochondriích. Zároveň je zobrazen přenos H^+ , kde je zřejmé, že CII se na přenosu nepodílí a přímý podíl mají pouze CI, CIII a CIV. Zobrazena je také ATP syntáza, která bývá označována za pátý komplex (CV) (Letts et al, 2017).

Protony, jež se nahromadily na druhé straně mitochondriální membrány, se pokoušejí dostat zpátky na původní stranu membrány, což je jim umožněno právě skrz ATP syntázu. Tento přístup protonů přes jednotku F_o způsobí rotaci c-kroužku, tato rotace je přenášena na jednotku F_1 přes centrální stopku. Rotace způsobí konformační změny mezi podjednotkami α a β , což vede k syntéze ATP z ADP a P_i . Periferní stopka zabraňuje rotaci celé F_1 jednotky, aby docházelo pouze k rotaci jejích podjednotek (Song et al, 2018).

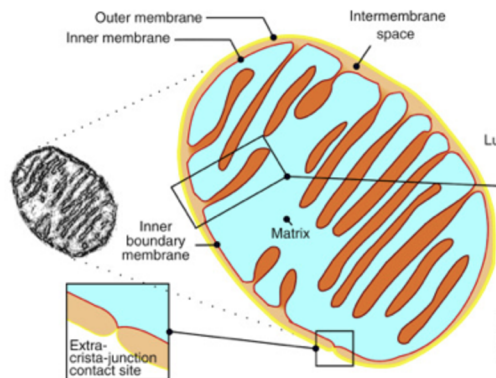
1.1.1.2. Hydrolýza ATP pomocí F_0F_1 ATP syntázy

V běžných fyziologických podmínkách ATP syntáza syntetizuje ATP za využití Δp . Ovšem, za určitých, často patofyziologických podmínek, může ATP hydrolyzovat (obrácený režim) (Nesci et al, 2015). K tomuto režimu mitochondrie přistupuje v určitých zhoršených podmínkách. Touto hydrolýzou ATP syntáza přispívá k udržení $\Delta\Psi_m$ na potřebné hladině pomocí přepumpování protonů ven z matrix (Chinopoulos et al, 2009).

Hydrolytická funkce ATP syntázy bývá nejčastěji spojena s nedostatkem kyslíku (Grover et al, 2008), při kterém dojde k depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány. K hydrolýze ATP pak buňky přistupují ve chvíli, kdy $\Delta\Psi_m$ klesne na hodnotu, která je označována jako „reverzní potenciál“ ($E_{rev-ATPase}$) (Chinopoulos, 2011).

1.1.1.3. Ohýbání vnitřní mitochondriální membrány

Mitochondrie jsou charakteristické tím, že jsou ohraničeny dvěma membránami, vnější a vnitřní membránou, které vymezují dva prostory: mezimembránový prostor mezi nimi a vnitřní prostor, tzv. matrix. Právě na vnitřní membráně mitochondrií se nachází ETC, který zajišťuje tvorbu Δp , následně využitý ATP syntázou. Za účelem zvětšení tohoto prostoru, kde se ETC nachází, a tím spojeného navýšení syntézy ATP, se formuje vnitřní membrána do útvarů nazývaných kristy (Obr. 3) (Paumard et al, 2002). Výskyt krist je známkou aerobního života, právě kvůli svému propojení s OXPHOS. Typicky se kristy nenacházejí v organismech žijících v anaerobním prostředí (Wilkens et al, 2013).



Obrázek 3: Mitochondrie s kristami. Jsou zobrazeny obě membrány, vnitřní (inner membrane) a vnější (outer membrane), označen je také mezimembránový prostor (intermembrane space) a matrix. Oranžové útvary jsou kristy zasahující do matrix a vystupující z vnitřní membrány (Pánek et al, 2020).

Za tvorbu krist je s největší pravděpodobností zodpovědný multiproteinový komplex „mitochondrial contact site and cristae organization system“ (MICOS). V kristách se nacházejí úzké krčky (crista junction, CJs) zajišťující spojení krist s vnitřní mitochondriální membránou. Právě zakřivení těchto CJs je katalyzováno MICOS, konkrétně Mic10 a Mic60 (Kaurov et al, 2018). Mic60 je komplex, který se nachází přímo v CJs a je zodpovědný za jejich tvorbu. Kromě Mic60 jsou důležité i další komplexy MICOS, včetně Mic10. Tyto komplexy jsou důležité pro tvorbu a tvar CJs. Jejich postupné delece mohou způsobovat změnu struktur krist. Bylo prokázáno, že ztráta Mic60 a Mic10 vede k úplné absenci CJs a ztrátě krist, což je důvodem považování Mic60 a Mic10 za nejdůležitější (Anand et al, 2021).

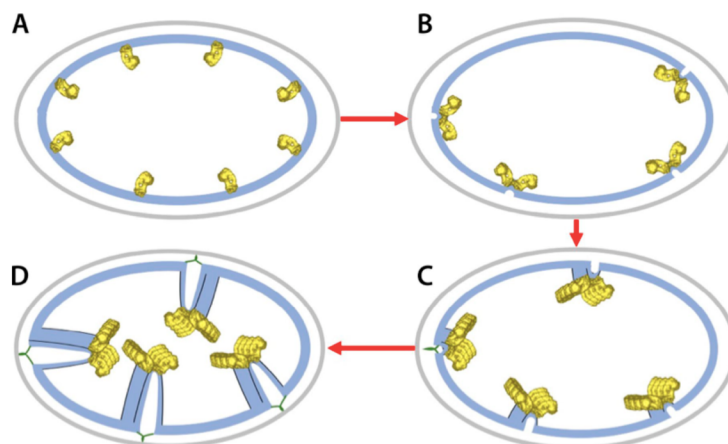
Kristy se vyskytují v odlišných formách v různých eukaryotických liniích. Roku 1993 Seravin, L. N. navrhl první klasifikaci typů a forem mitochondriálních krist, na kterou následně navazuje a ve své studii z roku 2020 ji rozšiřuje Pánek. Kristy jsou rozděleny v základě na dvě skupiny, a to ploché a tubulo-vezikulární. Ploché jsou rozděleny na další dvě kategorie a tubulo-vezikulární na další tři kategorie. Mezi ploché se řadí diskoidální (nacházející se např. u trypanozom, (Kaurov et al, 2018)) a lamelární (nacházející se např. v savčích mitochondriích kuřecího mozečku, (Frey et al, 2000)) kristy. Naopak tubulo-vezikulární se dělí na tubulární (nacházíme např. u trepek, (Mühleip et al, 2016)), vezikulární (nacházíme např. u rodu

Parvilucifera, (Garcés et al, 2010)) a nepravidelné tubulo-vezikulární (vyskytující se např. u zelených řas, konkrétně u zástupců rodu *Polytomella*, (Blum et al, 2019)) kristy (Pánek et al, 2020, Seravin et al, 1993). Ač se nachází souvislost mezi výskytem MICOS a obecnou tvorbou krist, tak nebyla prokázána souvislost mezi výskytem specifických MICOS a odlišným druhem krist. Tedy, lze říci, že odlišné druhy krist nejsou nijak ovlivňovány MICOS (Muñoz-Goméz et al, 2015).

1.1.1.4. Dimerizace ATP syntázy

Veškeré studované mitochondriální ATP syntázy vytváří dimery, u chloroplastů a bakterií se dimery nevyskytují. Je předpokládáno, že za tvorbu dimerů jsou zodpovědné nadbytečné podjednotky, které se vyskytují pouze u mitochondriální ATP syntázy (Savar et al, 2022, Anselmi et al, 2018).

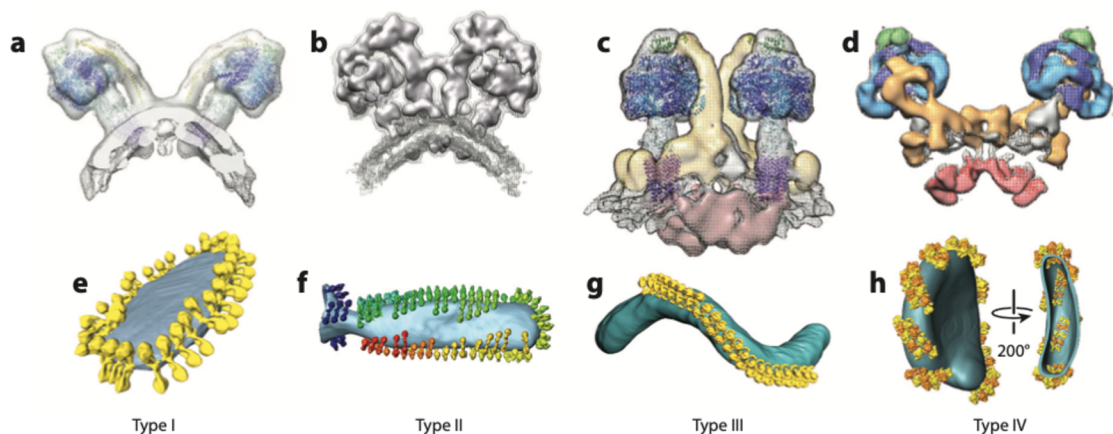
Právě dimery by mohly být zodpovědné za prohýbání vnitřní mitochondriální membrány a tím za utváření krist. Je možné, že na počátku biogeneze každé mitochondrie se právě na vnitřní membráně začnou utvářet dimery ATP syntázy, které označují místa, kde bude následně docházet k invaginaci (zprohýbání). Jak mitochondrie roste, tak se vnitřní membrána přednostně prohýbá právě v místech, kde se nachází dimery ATP syntázy (Obr. 4) (Anselmi et al, 2018)



Obrázek 4: Obrázek naznačuje utváření krist způsobené dimerizací ATP syntázy. Žlutě jsou zobrazeny dimery ATP syntázy utvářející se na vnitřní mitochondriální membráně. Postupně je zřejmé zvětšování dimerů, které nejspíše souvisí se zvětšováním krist. Je patrná invaginace mitochondriální membrány v místech, kde se nacházejí dimery (Anselmi et al, 2018).

Dimery se od sebe odlišují na základě kontaktu mezi periferní stopkou a F_0 jednotkou, což vedlo k rozdělení dimerů ATP syntázy do čtyř kategorií (typ I – IV). Strukturálně jsou tyto typy dobře prozkoumány pomocí cryo-elektronové mikroskopie (Kühlbrandt, 2019).

Zvířata a houby jsou charakteristické ATP syntázou typu I, což je také nejznámější typ dimeru. Dimery tohoto typu se spojují do dlouhých řad, což zapříčiní lokální zakřivení membrány na okrajích krist. Úhel, jenž spolu dimery svírají, se pohybuje okolo 86° (Davies et al, 2011). Typ II, charakteristický pro zelené řasy, je ojedinělý především tím, že má velmi masivní stopku, což zapříčiní větší velikost a také zdánlivě větší pevnost dimeru. Mezi sebou dimery svírají úhel 56° (Vázquez-Acevedo et al, 2016). Dimery typu III se nachází u protist (nálevníci a výtrusovci), a vedle sebe se nacházejí ve velmi těsném kontaktu, což vede k dlouhým pravidelným spirálovitým řadám. Jejich velmi blízkému kontaktu také nasvědčuje to, že úhel mezi dvěma ATP syntázami je prakticky rovný 0 (Mühleip et al, 2016). Typ IV, vyskytující se u Euglenozon, (např. *Trypanosoma brucei*), má určité rysy společné s typem III. Periferní stopky jsou odsazené. Jednotka F_1 má tvar pyramidy, oproti obvyklému kulovitému tvaru. Velikost úhlu se pohybuje okolo 55° (Mühleip et al, 2017) (Obr. 5).



Obrázek 5: Různé druhy dimerů ATP syntázy zobrazeny jak na mitochondriální membráně, tak i samostatně. Je zřejmé odlišné vytváření řad na membráně a také odlišný vzhled dimerů jako takových, tedy dvou ATP syntáz vedle sebe. Nahoře se vždy nachází jeden dimer pro určitý typ a pod ním se nachází řady, které daný typ vytváří na membráně. Zobrazeny jsou také úhly vyskytující se v dimeru (Kühlbrandt, 2019).

Bylo ukázáno, že za stabilitou dimerů typu I stojí podjednotky e a g (Davies et al, 2012). V případě, že došlo k odstranění jedné z těchto podjednotek byla patrná absence dimerů. Zároveň se dá odvodit, že tyto podjednotky, díky tomu, že se podílejí na tvorbě dimerů, se podílejí na vytváření krist. Absence těchto podjednotek nemá vliv přímo na životnost buněk za ideálních růstových podmínek, tedy podmínek, kdy má buňka dostatek glukózy a dalších esenciálních látek. Pouze u buněk dojde ke snížení schopnosti růstu až o 60 %. Zároveň ale membránový potenciál těchto buněk klesl až o 80 % (Bornhövd et al, 2006). Což může souviset s tím, že absence krist způsobí zmenšený povrch pro OXPHOS.

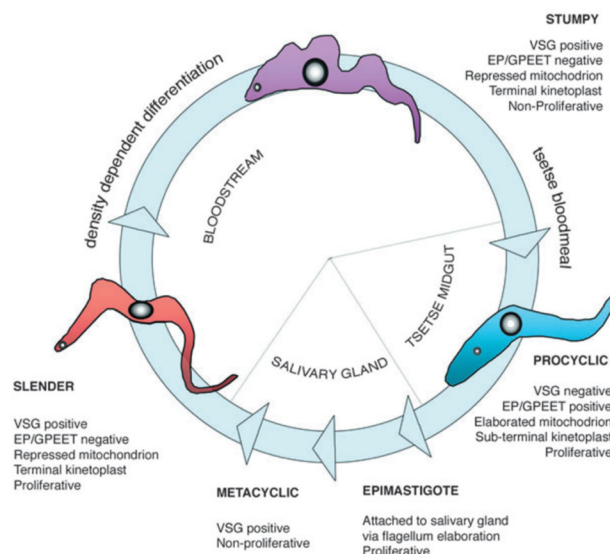
Role mitochondriálních dimerů za fyziologických podmínek u různých typů buněk není ještě zcela pochopena. Je zřejmé, že kristy jsou formovány za pomoci dimerů, ale není ještě zcela zodpovězeno, jakou roli hraje vztah dimerů a krist pro organismus za různých podmínek (Kühlbrandt, 2019).

1.2. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei a jeho ekotypy (*T. b. brucei*, *T. b. gambines* a *T. b. rhodesiense*) je jednobuněčný eukaryot, řadící se do řádu Trypanosomatida, která se řadí mezi prvky třídy Kinetoplastea (Hellemond et al, 2005). U lidí je původcem spavé nemoci (Human African trypanosomiasis, HAT) a u zvířat, jako jsou krávy a koně, způsobuje onemocnění nagana. Spavá nemoc je přenášena přes mouchu tse-tse, která působí jako biologický vektor. HAT ohrožuje lidi žijící především v subsaharské Africe. *T. brucei* napadá nejprve krev, lymfu a podkožní tkáň, což je doprovázeno bolestmi kloubů, hlavy a horečkou. Parazit následně proniká do centrálního nervového systému, což způsobuje u pacienta změnu chování, zmatenost, letargii, a nakonec kóma následované smrtí. Na tuto nemoc neexistuje velké množství léků a většina jich je zastaralých (Favaro et al, 2023). Ovšem, nedávno byl na trh uveden nový lék flexinidazol, který funguje jako inhibitor syntézy DNA a je velice účinný na léčbu HAT (Deeks, 2019).

1.2.1. Životní cyklus *T. brucei*

T. brucei během svého složitého životního cyklu střídá dva hostitele. S ohledem na to, že v každém hostiteli se nachází odlišné prostředí, kterému se musí parazit přizpůsobit, tak mění svou morfologii, genovou expresi, signální dráhy a metabolismus. Rozlišujeme dvě základní formy, a to formu hmyzí (procyklická forma, PCF) a formu savčí (krevní forma, BSF) (Alencar et al, 2022). *T. brucei* je přenášena mezi mouchou tse-tse (glossina), kde se nejdříve nachází ve střevě mouchy a následně migruje do slinných žláz, kde se připravuje na přenos do savčího hostitele. V savcích přežívá parazit v krevním řečišti hostitele. V krevním řečišti se *T. brucei* nachází v podobě dlouhých štíhlých forem (slender), které jsou ovšem následně nahrazeny kratšími formami (stumpy). K této přeměně dochází ze dvou hlavních důvodů, za účelem omezení dělení parazita, což zvyšuje přežití hostitele, a také za účelem zadržení kratších forem ve fázi G1 buněčného cyklu, což je důležité pro následné morfologické změny v mouše tse-tse (Obr. 6) (Matthews, 2005).



Obrázek 6: Životní cyklus *T. brucei* mezi dvěma odlišnými hostiteli. Růžově je znázorněna dlouhá štíhlá forma nacházející se v krevním řečišti savců. Tato forma se následně přeměňuje do kratší formy (fialová), ve které bude přenesena do mouchy tse-tse, kde se parazit přeměňuje na PCF (modrá) (Matthews, 2005)

Právě mezi danými formami dochází kromě morfologických i k metabolickým změnám. Největší rozdíl se nachází v metabolismu *T. brucei*. Štíhlá BSF má velmi jednoduchý metabolismus, který je závislý na procesu glykolýzy, kdy je glukóza rozkládána na pyruvát. Při diferenciaci do PCF dochází k prodloužení metabolické dráhy, ve které pyruvát není finálním produktem, ale je dále metabolizován uvnitř mitochondrií, a jeho rozklad je spřažen s procesem OXPHOS (Hellemond et al, 2005).

Velmi důležitý rozdíl se nachází v mitochondriích ve využití ATP syntázy. V PCF je ATP generováno procesem OXPHOS, během kterého je pomocí CIII a CIV vytvářen Δp , jenž je následně spojen s tvorbou ATP skrz ATP syntázu. Stejně jako u jiných eukaryot, i u PCF se ATP syntáza formuje do dimerů, které jsou důležité pro tvorbu krist a pro zlepšení podmínek pro generování ATP. V BSF je to ovšem odlišné, mitochondrie má zmenšený objem a nenachází se zde OXPHOS. ATP je generováno procesem glykolýzy v cytosolu parazita. $\Delta\Psi_m$, který je běžně vytvářen ETC, je zde udržován pomocí obráceného režimu ATP syntázy. S tímto rozdílem také není překvapivé, že mitochondrie BSF mají značně odlišnou, redukovanou, morfologii (Deware et al, 2022, Zíková et al, 2022). PCF *T. brucei* má mitochondrie obsahující kristy, související s produkcí ATP. Na druhou stranu, u BSF *T. brucei* je struktura mitochondrií velmi redukována.

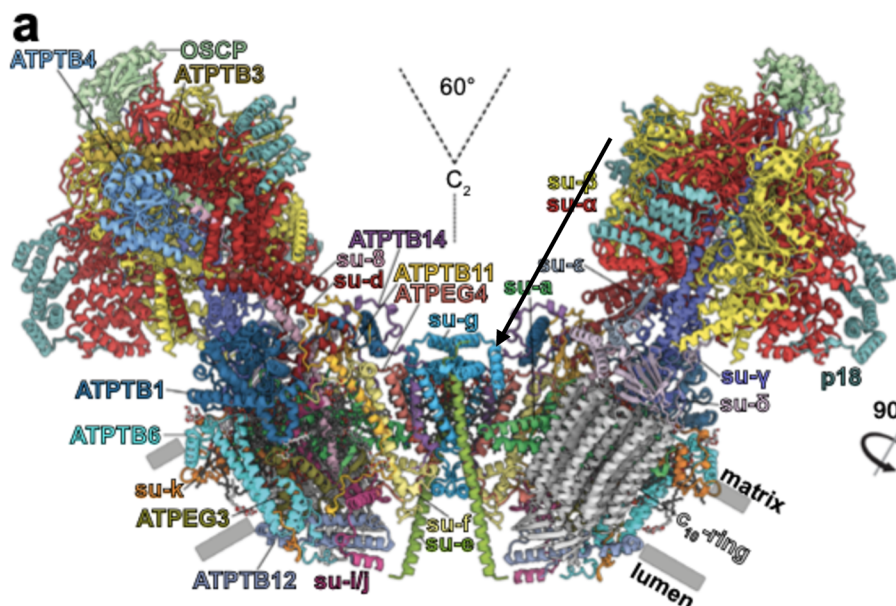
V BSF jsou krystaly pozorovány zřídka, a když už jsou pozorovány, tak se jedná o tubulo-vezikulární typ krystalu, na rozdíl od diskovitěho tvaru u PCF (Bílý et al, 2021).

1.2.2. Dimerizace u *T. brucei*

Mitochondriální ATP syntáza se spojuje do dimerů, které se nacházejí na vrcholcích krystalů. Role tvorby dimerů bývá nejčastěji přičítána podjednotkám e, g a k, které byly poprvé objeveny právě v dimerech ATP syntázy u kvasinek (Davies et al, 2012).

Dimery ATP syntázy se skládají ze dvou identických monomerů. Pokud dojde k disociaci dimerů ATP syntázy na monomery, má to za následek ztrátu krystalu, což způsobí narušení mitochondriální funkce (Davies et al, 2012).

Bylo prokázáno, že dimerizace ATP syntázy *T. brucei* je závislá na jedné konkrétní podjednotce F_0 jednotky, konkrétně na podjednotce g (Obr. 7). Tato podjednotka přispívá k intermonomerním kontaktům a její delece způsobí celkovou absenci dimerů a následný vznik defektních krystalů (Gahura et al, 2021).



Obrázek 7: Zobrazuje dimer ATP syntázy s vyznačenými podjednotkami. Světle modře (šipka) je označena podjednotka g, u které je zřejmé, že se podílí na interakci mezi oběma ATP syntázami.

(Gahura et al, 2021).

Při pokusech na PCF *T. brucei*, u nichž byla odstraněna podjednotka g, bylo prokázáno, že ztráta této podjednotky vedla ke specifické ztrátě dimerů a k současné akumulaci monomerů. To prokázalo, že daná podjednotka je nutná pro stabilitu dimerů, ale ne pro sestavení a stabilitu monomerů. U této buněčné linie byl také pozorován snížený výskyt krist a jejich abnormální morfologie. Také bylo ukázáno, že ztráta podjednotky g u linií, které byly rostlé v médiu s dostatečným množstvím glukózy, neměla příliš velký vliv na růstový fenotyp, stejně tak je zanedbatelná změna schopnosti buněk přečerpávat protony přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí ATP syntázy in vitro. Byl ovšem pozorován zhruba 50% úbytek ATP produkovaného pomocí OXPHOS, což lze přičíst zmenšenému množství krist. Růst ale ovlivněn nebyl, nejspíše díky tomu, že buňka získávala ATP z procesu glykolýzy a mitochondriální substrátové fosforylace. V momentě, kdy byly buňky kultivovány v médiu s menším množstvím glukózy došlo k zastavení růstu. To má souvislost s tím, že v médiu bohatém na glukózu a za přítomnosti prolinu není OXPHOS jediným zdrojem buněčného ATP a ztráta dimerů je tedy částečně nahrazena procesem glykolýzy. Pokud ovšem je buňka v prostředí, které obsahuje pouze prolin jako nutriční zdroj a ATP musí být generováno procesem OXPHOS, dojde k zastavení růstu buněk parazita. Data tedy ukazují, že dimerizace je klíčová, pokud se buňky nacházejí v prostředí, kdy musí probíhat OXPHOS (Gahura et al, 2022).

Tento experiment probíhal u PCF buněk *T. brucei*, u nichž je tvorba ATP závislá na OXPHOS. Cílem mé bakalářské práce tedy bylo zjistit, zda je dimerizace ATP syntázy důležitá také u BSF, kde OXPHOS nehraje žádnou roli, protože ATP je generováno zcela z procesu glykolýzy a redukováná mitochondrie obsahuje malý počet krist.

1.2.3. Diferenciace mezi BSF a PCF *T. brucei* in vitro

Po infikování hostitele se parazit nachází v krevním řečišti ve formě štíhlých buněk, které se mohou nekontrolovaně množit. Tato nekontrolovaná replikace by ovšem rychle zabila hostitelský organismus. Kvůli tomu je důležité regulovat růst parazita, toho je dosaženo pomocí diferenciace štíhlé formy (long slender, LS) na formy, které mají zastavený buněčný cyklus. Tyto formy jsou charakteristické kratším zaobleným tvarem (short stumpy, SS). Tato

přeměna a zastavení růstu prodlužuje dobu infekce a tím zvyšuje pravděpodobnost přenosu do hmyzího přenašeče (Silvester et al, 2017).

Tato SS forma prochází částečnou metabolickou preadaptací, jenž ji umožní přežití v prostředí s nízkým obsahem glukózy, kterému bude vystavena v mouše tse-tse. V mouše tse-tse se SS diferencuje na PCF, která si ATP generuje pomocí OXPHOS. Diferenciaci LS do SS a následně do PCF je možné provést v laboratorních podmínkách za specifických podmínek (Kabani et al, 2009). Během této diferenciace parazit prochází výraznou změnou týkající se ultrastruktury mitochondrie a jejího metabolismu. Metabolismus SS nebyl detailně studován, bylo ovšem prokázáno, že se u této formy vyskytuje větší množství mitochondriálních proteinů, ve srovnání s LS. V souladu s tímto zjištěním je předpoklad, že SS může využívat jak procesu glykolýzy, tak částečně i mitochondriální substrátové fosforylace (Dewar et al, 2018) a má více vyvinuté kristy. Trypanozomy a systém in vitro diferenciace představují cenný nástroj, jak studovat molekulární mechanismy a hlavní hráče účastnící se biogeneze mitochondriálních krist. K tomuto účelu bylo mým úkolem vytvořit BSF linii *T. brucei*, která nebude obsahovat dimery ATP syntázy a využít tento buněčný model pro studium úlohy dimerů ATP syntáz pro biogenezi krist.

2. Cíle práce

- Vytvořit geneticky modifikovanou linii *Trypanosoma brucei* s absencí genu pro podjednotku g ATP syntázy
- Ověřit vliv ztráty podjednotky g na
 - Růst buněk *Trypanosoma brucei*
 - Formování/Stabilitu dimerů ATP syntázy
 - Hladinu různých podjednotek ATP syntázy
 - Senzitivitu vůči oligomycinu, inhibitoru ATP syntázy

3. Metody

3.1. Molekulární klonování

Cílem této práce bylo vytvoření buněk s absencí podjednotky g ATP syntázy u BSF *T. brucei*. K dispozici jsem měla pouze divoký typ BSF *T. brucei*, který ve svém genomu nemá žádné genetické modifikace. Aby bylo možné odstranit gen pro podjednotku g, musela jsem pomocí molekulárního klonování vytvořit specifické kazety, které sloužily k delecí daného genu z genomu pomocí homologní rekombinace. Nejdříve byla vytvořena single knock-out linie (sKO), tedy linie s absencí jedné alely, a tato buněčná linie byla následně použita k vytvoření tzv. double knock-outu (dKO), tedy buněčné linie s absencí obou alel.

Molekulární klonování se skládá z několika kroků, které vedou k postupné úpravě genetické informace daného modelového organismu. Tento postup se neobejde bez několika nezbytných kroků, kam se řadí metoda polymerázové řetězové reakce, ligace namnožené DNA do bakteriálního plasmidu a jeho transformace do bakterií, které jsou schopny se rychle rozrůst a tím dodat dostatečné množství materiálu.

Další velmi důležitou částí je vytvoření DNA kazety s genem pro antibiotickou rezistenci, která bude sloužit pro delecí daného genu homologní rekombinací. Po transfekci vytvořené kazety dojde k selekci geneticky modifikovaných buněk a ověření správného vložení genetické modifikace na základě selekce pomocí antibiotik.

3.1.1. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR)

PCR je jedna z nejzákladnějších metod molekulárního klonování. U PCR dochází k amplifikaci jedné nebo několika kopií určitého kousku DNA, tím dochází k vytvoření velkého množství kopií námi vybraného úseku DNA. Samotná PCR se skládá ze tří hlavních kroků, a to denaturace DNA, nasednutí primerů a extenze daného úseku DNA (syntéza nového řetězce) (Joshi et al, 2010).

Primery musí být pro každý úsek použity dva, první ohraničuje začátek (tzv. Forward primer, For) a druhý ohraničuje konec amplifikovaného úseku (tzv. Reverse primer, Rev).

Mnou navržené a použité primery jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

Název	Velikost (bp)	Využití
AZ1364	543	Úprava 5'UTR
AZ1365	543	Úprava 5'UTR
AZ1366	548	Úprava 3'UTR
AZ1367	548	Úprava 3'UTR
AZ1576	588	Ověření sKO 5'UTR
AZ0097	588	Ověření sKO 5'UTR
AZ1575	1048	Ověření sKO 3'UTR
AZ0098	1048	Ověření sKO 3'UTR
AZ1576	834	Ověření dKO 5'UTR
AZ0099	834	Ověření dKO 5'UTR
AZ1575	753	Ověření dKO 3'UTR
AZ0100	753	Ověření dKO 3'UTR
AZ1368	435	Ověření dKO ORF
AZ1369	435	Ověření dKO ORF

Tabulka 1: Použité primery, jak pro vytvoření selekčních kazet, tak pro následné ověření vytvořených linií také pomocí metody PCR.

Zvolené úseky DNA byly amplifikovány pomocí PCR s OneTaq polymerázou (New England BioLabs, Inc.). Pro danou PCR byla potřeba templátová genomická DNA (gDNA) z *T. brucei* v koncentraci 150 ng/μl, For a Rev primery (1 μM), pufr, volné nukleotidy (dNTP) (200 μM), One taq polymeráza (1x) a MiliQ voda, která doplnila množství směsi do 50 μl (Tab. 2).

Po namíchání byla směs podrobena procesu PCR. PCR sestává z několika kroků, během kterých dochází ke střídání teplot (Tab. 3). Celý cyklus se opakuje 30-35x. Po dokončení všech cyklů dojde k vyhodnocení výsledků na agarózovém gelu.

Chemikálie	Množství (na 50 μ l)
MiliQ	Zbývající do 50 μ l
Standardní reakční pufr (5x)	10 μ l
DNA (150 ng/ μ l)	1 μ l
dNTP (200 μ M)	1 μ l
For primer (1 μ M)	1 μ l
Rev primer (1 μ M)	1 μ l
OneTaq (1,25 U)	0,25 μ l

Tabulka 2: Směs PCR

Krok	Teplota	Délka
1	94°C	30 s
2	94°C	30 s
3	52°C	30 s
4	68°C	1 min
5	68°C	5 min
	Opakování kroků 2-4	30-35x
6	4°C	Udržovací

Tabulka 3: Teploty PCR

3.1.2. Gelová elektroforéza a izolace DNA z agarózového gelu

Samotný gel se připravuje ze sypké směsi agarózy. Díky tomu je možné vytvořit gely o různé koncentraci. Já jsem standardně využívala gel s 0,8% koncentrací agarózy.

Sypká agaróza se smíchá s 1xTAE pufrům (40 mM Tris-base, 20 mM kyselina octová, 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), pH 8,3) a po smíchání byla zahřáta až do

úplného rozpuštění agarózy. Po vytvoření zcela homogenní směsi došlo k zchlazení pod tekoucí vodou. Byl přidán ethidium bromid (0,7 μ M), interkalační činidlo, které se váže na DNA a po ozáření UV světlem emituje světlo, čímž usnadňuje vizualizaci amplifikované DNA. Směs byla nalita do vaničky s hřebínkem, ve které byla ponechána zatuhnout, čímž se vytvořil gel. Po zatuhnutí byl odstraněn hřebínek, díky čemuž došlo k vytvoření jamiček, do kterých se napipetoval daný vzorek, ke kterému byla přidána barvička, která umožňuje vizualizaci migrace vzorků gelem. Gel byl přemístěn do přístroje na gelovou elektroforézu obsahující 1xTAE pufr, do kterého byl zcela ponořen. Do úplně první jamky bylo napipetováno 10 μ l GeneRuler 1 kb Plus DNA ladderu (Thermo Scientific) kvůli určení velikosti amplifikovaných oblastí. Dále byly napipetovány vzorky, každý vzorek do jedné jamky. Gelová elektroforéza běžela po dobu 45 minut při 90-100 V. Po uběhnutí době byl gel vizualizován pomocí přístroje Chemidoc MP Imaging System. Na agarózovém gelu došlo k rozdělení úseků DNA na základě velikosti. To nám umožnilo najít námi požadovaný úsek DNA, který byl vyextrahován z gelu pomocí kitu (GenElute Gel Extraction Kit (Sigma)), dle v kitu přiloženého protokolu.

3.1.3. Klonování 5'UTR a 3'UTR PCR produktu do plasmidů pLEW13 a pLEW90

K delecii obou alel specifického genu byla využita homologní rekombinace, pomocí které buňka zaklonuje do svého genomu na základě homologních sekvencí cizorodou DNA, v mém případě kazetu se selekčním markerem. Alely jsou vyřazovány postupně, kdy jako první je vyřazena jedna alela a jsou vytvořeny tzv. sKO buňky. Původní gen je nahrazen genem pro T7 polymerázu a selekčním markerem pro antibiotikum G418. Po selekci stabilních linií je druhá alela nahrazena genem pro tetracyklinový represor a dalším selekčním markerem pro antibiotikum hygromycin.

Jako první jsem musela zaklonovat do specifického plasmidu pLEW13 amplifikované 5'UTR (untranslated region, před start kodonem genu) a 3'UTR (oblast za stop kodonem genu) úseky genu pro podjednotku g.

3.1.3.1. Restrikce PCR produktu pomocí enzymů a příprava sKO a dKO kazety

Po PCR amplifikaci 5'UTR a 3'UTR fragmentů byly produkty, včetně plasmidu pLEW13, naštípány pomocí restrikčních enzymů. Pro zaklonování 5'UTR byly využity enzymy NotI a MluI. Pro zaklonování 3'UTR úseku a pLEW13 s 5'UTR byly využity primery XbaI a StuI.

Po vytvoření plasmidu pLEW13 s 5'UTR a 3'UTR byl tento produkt a plasmid pLEW90 naštípan restrikčními enzymy XhoI a StuI.

Restrikční směs se skládala z 10 µg plasmidové DNA, 2 µl od každého restrikčního enzymu a 5 µl 10xFD pufry, celkový objem činil 50 µl. Vzorek byl inkubován při 37°C po dobu 2 hodin.

3.1.3.2. Ligace

Naštípané úseky byly zaligovány do stejně připraveného vektoru pomocí ligační reakce.

K tomu byla využita ligační směs, kdy byl smíchán inzert a vektor v molárním poměru 3:1, 1 µl 10x ligačního pufry, 1 µl T4 DNA ligázy a 4,8 µl vody. Směs se nechala inkubovat přes noc při 4°C.

3.1.3.3. Transformace do bakterií

Po doběhnutí ligační reakce došlo ke transformaci ligační směsi do kompetentních bakterií XL-1 blue *E. coli*. Bakterie byly předem připravené členem laboratoře (díky patří Martině Slapničkové) a skladovány v mrazáku o teplotě -80°C. Po vyndání z mrazáku se bakterie inkubovaly 10–20 minut na ledu. Poté byly k 50 µl bakterií přidány 3 µl ligační směsi. Proběhla další inkubace po dobu 10–20 minut. Bakterie byly následně vystaveny teplotnímu šoku, teplota 42°C po dobu 45 sekund, a zchlazeny na ledu po dobu 2 minut. Do směsi pak bylo přidáno 250 µl S. O. C. média (0,5% kvasinkový extrakt, 2% trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM glukóza). Tato směs byla inkubována na třepačce při teplotě 37°C po dobu 45 minut. Po vyndání z třepačky bylo 250 µl směsi rozetřeno na misku s agarem (antibiotikum ampicilin, 100 µg/ml) a ponecháno do druhého dne v inkubátoru při 37°C.

3.1.3.4. Izolace plasmidové DNA z bakterií a ověření správnosti

klonování pomocí restriční reakce a sekvenování

Z jednotlivých bakteriálních kolonií byla vyizolována plasmidová DNA pomocí kitu (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma), přesně dle pokynů výrobce. Správnost klonování byla ověřena pomocí restriční reakce. Pro ověření správnosti byly plasmidy odeslány k sekvenování (Seqme s.r.o.).

Výsledky sekvenování byly analyzovány pomocí programu Geneious, kde byly porovnány s in silico vytvořenými správnými plasmidy, aby bylo potvrzeno, že molekulární klonování bylo úspěšné.

3.2. Kultivace buněk *T. brucei*

V této práci byl jakožto modelový organismus používán savčí parazit *Trypanosoma brucei*, konkrétně BSF. V mém případě se jednalo o linii Lister 427, kterou v této práci označuji jako divoký typ (wilde type, WT).

Buňky *T. brucei* byly kultivovány v základním médiu HMI-11 (HMI-11 premix, hydrogenuhličitan sodný, penicilin/streptomycin, destilovaná voda) s 10% fetálním hovězím sérem (Fetal bovine serum, FBS), anebo v médiu CMM, které obsahuje méně glukózy (10 mM) a dalších látek a lépe odpovídá prostředí savčího hostitele (Creek et al, 2013)

Buňky byly rostlé povětšinou ve 25 cm² kultivačních lahvičkách s 5 ml média v inkubátoru o teplotě 37°C a o 5% koncentraci CO₂.

3.2.1. Měření buněk

Koncentrace buněk byla zjišťována pomocí Z2 Coulter Counter (Beckman Coulter Inc.). 100 µl buněk bylo smícháno se 100 µl Trypanosomatid Cell Fix Solution (destilovaná voda, 60 mM roztok chloridu sodného a citronanu sodného (SSC) a 3,6% formaldehyd), jenž infekční buňky *T. brucei* usmrtí a umožní tedy bezpečnou manipulaci se vzorky. 50 µl směsi bylo smícháno

s 5 ml Hemosolu v kyvetě, která byla vložena do přístroje. Vyhodnocená koncentrace buněk byla zaznamenána a buňky byly vždy naředěny na koncentraci 2×10^5 buněk/ml.

3.2.2. Vytvoření stabilátů vytvořených linií

Geneticky modifikované buněčné linie byly za účelem dlouhodobějšího uchování buněk zamraženy v tekutém dusíku. Dobře narostlá kultura o koncentraci $1-2 \times 10^6$ buněk/ml byla smíchána v poměru 1:1 s Bloodform Freezing Solution (100 mM glukóza, 72 mM NaCl, 5 mM citronan sodný, 15 mM hovězí sérový albumin, 12% glycerol). Pro každou linii se vytvořilo několik stabilátů. Stabiláty se vložily na 30 minut na led. Po uplynutí byly přemístěny do -80°C po dobu 3 dnů a odtud předány do nádob s tekutým dusíkem pro dlouhodobé uchování.

3.3. Transfekce genetických modifikací do *T. brucei*

Při transfekci buněk dochází ke vložení geneticky modifikovaného úseku do genetické informace buněk za pomoci elektroporézy.

V případě našeho projektu musela transfekce proběhnout dvakrát, nejdříve muselo dojít k vytvoření sKO buněk, tedy k odstranění první alely pro podjednotku g. Tato transfekce probíhala do WT buněk.

Druhá transfekce probíhala do vytvořených sKO buněk za účelem odstranění druhé alely pro podjednotku g a došlo k vytvoření dKO linií.

Buňky výměnou za přijetí našeho genu obdržely rezistenci vůči antibiotiku, jenž byla součástí kazety. Pomocí této rezistence lze vyselektovat buňky u kterých skutečně došlo k odstranění alely pro podjednotku g.

3.3.1. Příprava linearizované DNA

Před přistoupením k samotné transfekci je potřeba plasmidovou DNA linearizovat, aby došlo k efektivnímu vložení lineární DNA do genomu. Plasmidy k tomu určené (15 μg) byly naštípány enzymem NotI v restriční směsi o objemu 120 μl , která byla přes noc inkubována při 37°C .

Poté byla linearizovaná DNA precipitována pomocí 3 M octanu sodného (0,1 objemu z celkového objemu) a 97% etanolu (2,5 objemu). Směs byla zvortexována a ponechána 30 minut inkubovat v -80°C . Poté byly vzorky stočeny po dobu 30 minut a při -4°C na 16000xg. Pelet byl promyt 200 μl studeného 70% etanolu.

Po dalším stočení vzorku byl ve sterilním prostředí odstraněn supernatant, pelet DNA byl ponechán na vzduchu vyschnout a poté byl rozsuspendován ve 30 μl sterilní destilované vody, která byla předem přehřáta na 65°C .

Ověření restrikce a úspěšnosti precipitace bylo provedeno pomocí agarózového gelu a koncentrace DNA byla zjištěna pomocí nanodropu.

3.3.2. Transfekce

Pro transfekci bylo potřeba 3×10^7 buněk o koncentraci $0,6 \times 10^6$ buněk/ml. Rozrostlé buňky byly stočeny při pokojové teplotě po dobu 10 minut při 1300xg a následně promyty pomocí 10 ml PBS (150 mM NaCl, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4).

Získaný pelet byl rozsuspendován ve 100 μl AMAXA Human T-cell pufru (81,8 μl Human T-cell nucleofactor + 18,2 μl Supplement) o teplotě 4°C . Celá směs byla přenesena do elektrokvyety, ve které již bylo připraveno 10-12 μg přečištěné linearizované DNA. Kyvetka byla vložena do elektroporátoru Amaxa a byl spuštěn program X-001.

Po proběhnuté elektroporéze byl veškerý obsah z kyvety přenesen do falkonky A, která obsahovala 30 ml média HMI-11. Následně byly buňky postupně dvakrát naředěny. Byly odebrány 3 ml a přeneseny do falkonky B s 27 ml média. Z falkonky B byly znovu odebrány 3 ml a přeneseny do falkonky C do celkového objemu 30 ml.

Obsah každé falkonky byl následně rozpipetován po 1 ml do 24 jamkové destičky. Destička byla následně ponechána inkubovat v inkubátoru po dobu 16 hodin.

3.3.3. Selekcce pomocí antibiotik

Pro úspěšnou selekci geneticky pozměněných buněčných linií se využila rezistence vůči antibiotikům, jejíž gen se nacházel v připravené sKO a dKO kazetě.

Po 16 hodinách od transfekce bylo připraveno médium obsahující dvojnásobné množství selekčního antibiotika. V případě sKO linie buněk se jednalo o antibiotiku G-418 (selekční koncentrace 15 µg/ml) a pro dKO linii to bylo antibiotiku hygromycin (selekční koncentrace 25 µg/ml). Toto médium bylo po 1 ml přidáno do každé jamky třech destiček, čímž se buňky vystavily danému antibiotiku a byla zahájena selekce buněk. Buňky, obsahující modifikovanou informaci, s rezistencí vůči antibiotiku tuto selekci přežily. Naopak, buňky, které kazetu neobsahují, tuto selekci nepřežily.

3.4. SDS–polyakrylamid gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pomocí metody SDS-PAGE je možné rozdělit proteiny na základě jejich velikosti v denaturovaném stavu.

3.4.1. Příprava buněčného lyzátu

Buněčný lyzát byl připraven z celkového množství 1×10^8 buněk, toto množství je dostatečné pro cca 10 vzorků. Buňky byly stočeny po dobu 10 minut při 1300xg při 12°C. Po stočení bylo odlito médium a ponechán jen pelet, v němž se nacházejí buňky

Pelet byl rozsuspendován v 1xPBS a převeden do 1,5 ml ependorf zkumavky. Buňky byly znovu stočeny po dobu 10 minut při 1300xg při teplotě 4°C.

Po stočení byl odstraněn supernatan a byl ponechán pouze pelet. Nyní bylo potřeba přidat 1xPBS a 3xSDS-PAGE nanášecím barvivo (150 mM Tris-HCl, 6% SDS, 30% glycerol, 300 mM DTT, 0,02% bromfenolová modř, pH 6,8). Pelet byl rozsuspendován v poměru 2:1 v 1x PBS a 3x SDS PAGE, tak aby finální koncentrace buněk odpovídala počtu 1×10^7 buněk/30 µl.

Ihned po přidání byly vzorky inkubovány v termobloku při 97°C po dobu 5-7 minut a následně uloženy do -20°C, kde byly uchovány po potřebnou dobu.

3.4.2. SDS-PAGE

Ke vlastní SDS-PAGE se v laboratoři využívá systém od firmy BioRad včetně předpřipravených (pre-cast) polyakrylamidových gelů o koncentraci 4-20 %. Gel byl vložen do aparatury, která

byla poté naplněna 1xSDS-PAGE running pufrem (250mM Tris-HCl, 193 mM glycin, 1% SDS, pH 8,3).

Vzorky bylo vhodné ještě pár minut zahřát v termobloku při teplotě 97°C, což zjednodušilo jejich pipetování. Vzorky byly pipetovány v množství 30 µl. Kromě vzorků byly napipetovány i 4 µl Prestained Protein Ladder (PageRuler).

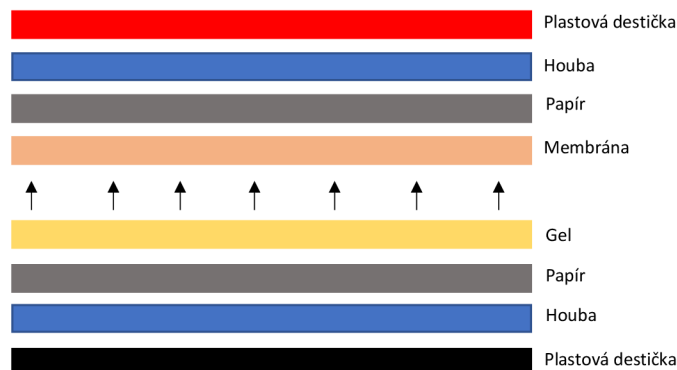
Elektroforéza nejdříve běžela při 90 V zhruba po dobu 20 minut, než vzorky vstoupily do gelu. Po této době došlo ke zvýšení napětí na 110 V a gel byl ponechán běžet zhruba 2 hodiny, dle toho, jak rychle vzorky migrovaly gelem.

3.4.3. Přenos proteinů na membránu

Po ukončení elektroforézy byl gel přemístěn do 1xSDS PAGE running pufru na 15 minut. Tato inkubace způsobí denaturaci proteinů, což způsobí následnou lepší vizualizaci na membráně. V době inkubace bylo potřeba aktivovat PVDF membránu (Thermo Scientific, 0,45 µm) pomocí metanolu po dobu 40 s a následným promytím ve vodě a inkubací v 1x transfer pufru (48 mM Tris, 39 mM glycin, 20% metanol, pH 8,3).

Pro přenos proteinů na membránu byl sestaven „sendvič“, jenž se skládal z černé plastové destičky, na tu byla položena houba, na ní blotovací papír, na který byl položen gel, následovala PVDF membrána, znovu papír, houba a nahoru červená plastová destička (Obr. 8). Vše bylo předem řádně namočeno do 1x transfer pufru. Po sestavení tohoto „sendviče“ byl celý umístěn do aparatury pro převod proteinů z gelu na membránu. Černá destička byla směrem k anodě a červená destička ke katodě. Celá aparatura byla naplněna 1x transfer pufrem. Přesun běžel po dobu 120 minut na 100 V při 4°C.

Po uběhnutí této doby byla sestava vyjmuta a rozebrána, abychom se dostali k membráně. Membrána byla vyjmuta a přemístěna do 5% mléka PBS-T (PBS s přídáním látky Tween), ve kterém byla ponechána rotovat po dobu 1 hodiny. Po uplynutí doby byla přes noc inkubována ve 4°C.



Obrázek 8: Sendvič pro převod z gelu na membránu, šipkami je vyznačeno, že proteiny se přesouvaly z gelu na membránu.

3.5. Izolace mitochondrií pomocí hypotonické lýze

Izolace mitochondrií z buněk *T. brucei* byla provedena za pomoci využití hypotonické lýze buněk dle standardního protokolu (Crude Mito Prep Optimized for BF, by MV) s následujícími detaily. Veškeré kroky byly prováděny na ledu a stočení se vždy provádělo při 4°C.

5x10⁸ buněk bylo stočeno při 1300xg po dobu 10 minut. Buňky v peletu byly rozsuspendovány v celkovém množství 40 ml SBG (150 mM NaCl, 20 mM glukóza, 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄) a znovu stočeny při 1300xg také po dobu 10 minut.

Pelet byl rozsuspendován v 4,16 ml DTE (1mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0), který způsobí hypotonické prostředí, kdy voda proniká dovnitř buňky a dochází k jejich zvětšování. Následnou aplikací tlaku pomocí dounceru dojde k jejich rozbití. Přidáním 728 μl 60% sacharózy se vytvoří izotonické prostředí, které zastaví lýzi buněk. Po tomto kroku se vzorky stočily při 15000xg po dobu 10 minut.

Bílý pelet s malým průměrem a určitým načechraným vzhledem je následně rozsuspendován v 852 μl STM (250 mM sacharóza, 20 mM Tris, 2mM MgCl₂, destilovaná voda, pH 8,0). Po důkladném rozsuspendování došlo k přidání 3,2 μl 1M MgCl₂, 3,2 μl 0,1M CaCl₂ a 2 μl 10U/2,5ul DNázy. Směs se nechala 1 hodinu inkubovat na ledu.

Po uplynuté hodině bylo přidáno 824 μl STE (250 mM sacharóza, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, destilovaná voda, pH 8,0) a vzorky byly stočeny při 15000xg po dobu 10 minut. Pelet byl následně ještě jednou promyt s 500 μl STE.

Výsledný pelet byl zmražen v tekutém dusíku a následně uchováván při -80°C.

3.6. Lýze mitochondrií a určení koncentrace proteinů

Vyizolované mitochondrie z $2,5 \times 10^8$ buněk byly resuspendovány v 40 μ l rozpouštěcího pufru A (50 mM NaCl, 50 mM Bis-Tris/HCl, 2 mM kyselina 6-aminokapronová (6-aminohexanoic acid, ACA), 1 mM EDTA, pH 7,0). Následně byl přidán 10% n-dodecyl β -maltosid (DDM) na výslednou koncentraci 2% a vzorky se inkubovaly 1 hodinu na ledu. Po uběhnutí inkubační doby byly vzorky stočeny při 16000xg po dobu 30 minut při 4°C. Stočení oddělilo rozpuštěné proteiny od nerozpuštěných. Supernatant, lyzát mitochondrií obsahující rozpuštěné proteiny, byl převeden do nové LoBind Eppendorf mikroskopické mikrokumavky.

Za účelem získání co nejlepších výsledků bylo potřeba, aby vzorky, které budou následně podrobeny gelové elektroforéze obsahovaly stejné množství materiálu na každý vzorek. Proto bylo potřeba zjistit koncentraci u všech vzorků. To bylo provedeno měřením proteinové koncentrace pomocí kitu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™).

Byly připraveny vzorky z albuminu hovězího séra o známé koncentraci (0-50-100-200-250-300-400-500 μ g/ml). Veškeré vzorky byly naředěny 10x.

Jak vzorky o známé koncentraci, tak i pro nás neznámý vzorek, byly napipetovány v množství 10 μ l do 96 jamkové destičky. Bylo přidáno 200 μ l roztoku připraveného dle návodu z kitu. K získání výsledku došlo po změření na destičkové čtečce (plate reader Tecan) při vlnové délce 562 nm a vypočítání koncentrace pro každý vzorek pomocí aplikace Microsoft Excel pomocí kalibrační křivky.

3.7. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

K ověření ztráty dimerů u dKO linií buněk byla použita Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). Jedná se o metodu, která umožňuje charakterizaci velkých proteinových komplexů v jejich enzymaticky aktivním stádiu, tedy během metody nedochází k použití denaturačního činidla typu SDS. V této metodě je používáno barvivo Coomassie Brilliant Blue-G250 (CBB G-250), které dodává proteinům negativní náboj, který je potřebný k tomu, aby mohly migrovat gelem.

Jako vzorky byly použity zlyzované mitochondrie v celkovém množství 4 μg lyzátu od každého vzorku. Příslušné množství μl vzorku bylo smícháno s 2 μl 50% glycerolu, 1,5 μl barviva (0,5 M ACA, 5% CBB G-250) a pomocí rozpouštěcího pufru A doplněno do celkového objemu 20 μl . Po smíchání byla směs inkubována 10 minut na ledu.

Během inkubace byla připravena aparatura (XCell SureLock™ Electrophoresis Cell tank), do které byl umístěn předpřipravený gel NativePAGE, 3-12 %, Bis-Tris o tloušťce 1 mm a s 10 jamkami (Novex, Invitrogen).

Gel byl ponořen do katodového pufru (vstup, 50mM Bis-Tris/HCl, 50mM tricín, 0,002% CBB-G250, pH 7,0) a do anodového pufru (výstup, 50mM Bis-Tris/HCl, 50mM tricín, pH 7,0).

Po přípravě této sestavy, bylo do každé jamky napipetováno 20 μl od každého vzorku a do poslední jamky bylo nanášeno 7 μl NativeMark Unstained Protein Standard.

Elektroforéza byla ponechána pár minut běžet na 80 V maximálně s 15 mA. Po vstoupení vzorků do gelu byla aparatura přenesena do lednice, kde došlo ke zvýšení napětí na 100 V s limitem 15-25 mA. Takto byl gel ponechán běžet při 4°C po dobu 3,5 hodiny a na poslední půl hodinu došlo k dalšímu zvýšení napětí, tentokrát na 130 V a limitem 25 mA. Celková doba elektroforézy byla 4 hodiny.

3.7.1. Přenos proteinů na membránu

Pro BN-PAGE byl přenos proteinů na membránu proveden stejně, jak je popsáno výše (kapitola 3.4.3.) s pár rozdíly.

Po vyjmutí PVDF membrány po transferu byla membrána nůžkami rozstříhána na několik částí. Tyto kusy byly umístěny do 100% metanolu, aby došlo k odstranění barviva CBB G-250. Membrána byla ponechána uschnout. Poté byla opět promyta 100% metanolem, s následným promytím v PBS. Byla vložena do 5% mléka PBS-T a také ponechána inkubovat ve 4°C.

3.8. Prokazování přítomnosti proteinu na PVDF membráně pomocí protilátek

Po přenesení proteinů na membránu, bylo potřeba vizualizovat pro nás důležité proteiny. K tomu se využily protilátky namířené proti konkrétnímu proteinu. Použita byla primární a sekundární protilátka, kdy primární protilátka, která je buď myší nebo králíčí, se váže na námi zkoumaný protein. Proti této primární protilátce je cílena sekundární protilátka. Jedná se tedy buď o protilátku zaměřenou proti králíkovi (anti-rabbit) nebo protilátku proti myši (anti-mouse). Sekundární protilátka je imunohistochemicky značena a díky jejímu navázání je možné proteiny vizualizovat.

Námi použité protilátky i s jejich ředěním jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4). Tyto protilátky byly ředěny do 5 ml 5% mléka v PBS-T.

Membrány s mlékem, ve kterém je obsažena protilátka, hodinu rotovaly při pokojové teplotě. Po uplynutí době došlo k jejich promytí pomocí PBS-T (1x 15 minut, 3x 5 minut). Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou v ředění, které je uvedeno v tabulce (Tab. 4). Se sekundární protilátkou se nechaly membrány rotovat také hodinu při pokojové teplotě. Po uplynutí hodiny byly membrány znovu promyty, stejným způsobem, jak je popsáno výše.

Po dokončeném promytí se mohlo přistoupit k samotné vizualizaci. Byly použity ECL reaktanty (Biorad) smíchané v poměru 1:1 a nanесeny na membránu.

Toto umožnilo následnou vizualizaci, kdy se pomocí imunohistochemického značení sekundární protilátky vizualizovaly proteiny, na kterých byly protilátky navázány. Proteiny byly detekovány díky chemiluminiscenci, kdy sekundární protilátka je, v našem případě, značena pomocí křenové peroxidázy.

Protilátka	Ředění	Velikost (kDa)
α -ATPaseTb2	1:1000	43
α -ATPaseTb1	1:1000	47
α -OSCP	1:1000	27
α -p18	1:1000	18
α - β	1:5000	53,5
α -APRT	1:500	26
α -Hsp70	1:5000	70
Anti rabbit/mouse	1:2000	

Tabulka 4: Ředění použitých protilátek pro Western bloty

3.9. Alamar blue assay

Alamar blue assay je metoda využívána k určení cytotoxicity nějaké sloučeniny. Při této metodě se zkoumá metabolická aktivita prolifерujících buněk při vystavení určité toxické látky, v našem případě oligomycinu. Využívá se modré netoxické barvivo resazurin, a jeho schopnosti redukce na fluorescenční resofurin v metabolicky aktivních (vysoký poměr NADH:NAD⁺) prolifерujících buňkách. V rámci této metody je možné spočítat tzv. hodnotu EC50, což označuje koncentraci inhibitoru, látky, jenž způsobí 50% snížení maximální hodnoty fluorescence po specifikované době expozice.

Použita byla 96 jamková destička, do jejíchž krajních řad bylo napipetováno 200 μ l média, které ochrání zbylé jamky, ve kterých proběhne vlastní experiment, před vysycháním. Do všech ostatních jamek, s výjimkou předposlední, bylo napipetováno 100 μ l média. Do předposlední bylo média napipetováno 198 μ l. Do této jamky se přidaly 2 μ l 1mg/ml oligomycinu. Vše bylo důkladně promícháno a bylo odebráno 100 μ l, které byly přeneseny do sousední jamky. Znovu došlo k promíchání, odebrání 100 μ l a přenesení do další řady jamek. Toto přenesení bylo několikrát opakováno, tedy došlo ke vzniku gradientu koncentrace oligomycinu. Výsledné množství média v každé jamce odpovídalo 100 μ l.

Poté byly do připravené destičky napipetovány buňky (100 μ l buněk o koncentraci 1000 buněk/ml) ve třech technických replikátech. Destičky byly ponechány 72 hodin v inkubátoru.

Po uplynutí této doby bylo přidáno 20 μ l Resazurinu (0,125mg/ml v 1xPBS) a destička byla ponechána dalších 24 hodin v inkubátoru.

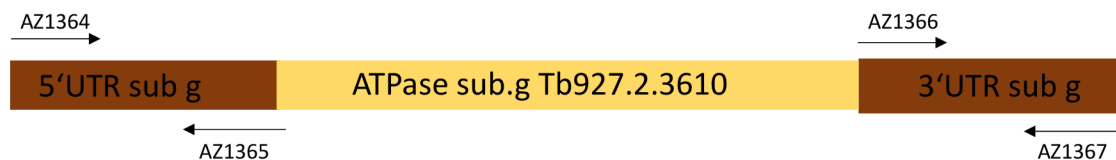
Po uplynutí této doby došlo ke změření fluorescence na Tecan Infinite při excitaci 544 nm a emisi 590 nm. Výsledky byly následně analyzovány pomocí aplikace GraphPad Prism a funkce nelineární regrese, koncentrace oligomycinu byla logaritmována, ve které byl vytvořen graf zobrazující výsledky a vypočtena hodnota EC50.

4. Výsledky

4.1. Příprava DNA kazety pro delecí první alely genu pro podjednotku g

K vyřazení obou alel pro podjednotku g byla využita tzv. double knock-out metoda, kdy dojde k výměně původní alely za kazetu obsahující selekční marker (pro každou alelu je kazeta jiná) a tím pádem k vytvoření buněčné linie, která neobsahuje původní alely pro gen pro podjednotku g. Odstranění první alely pro podjednotku g se událo výměnou za kazetu obsahující rezistenci vůči antibiotiku G-418 a T7 RNA polymerázu a následně druhé alely za kazetu obsahující tetracyklinový represor a rezistenci vůči antibiotiku hygromycin.

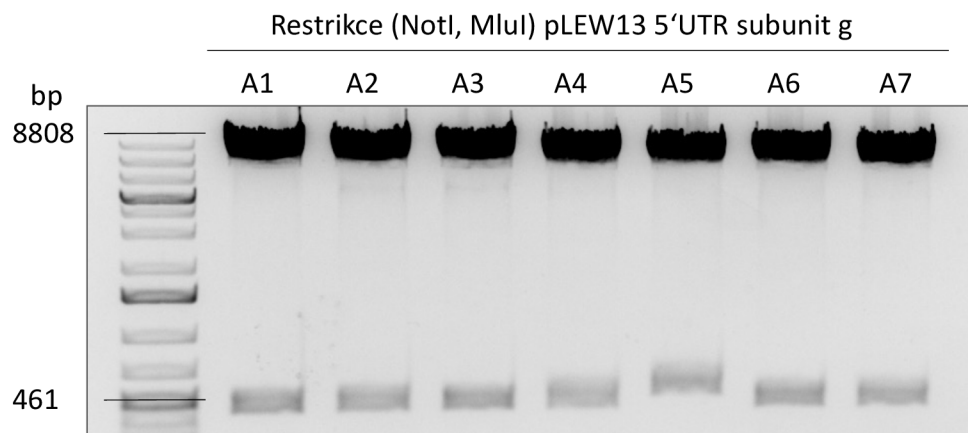
Pro přípravu první kazety jsem využila plasmidu pLEW13, jenž obsahuje geny pro T7 RNA polymerázu a rezistenci vůči G-418, do kterého jsem zaklonovala úseky pro 5'UTR a 3'UTR genu pro podjednotku g. Tyto dva úseky jsem namnožila pomocí metody PCR za využití dvou setů specifických primerů (pro 5'UTR primery AZ1364 a AZ1365, pro 3'UTR primery AZ1366 a AZ1367) (Obr. 9).



Obrázek 9: Původní alela pro podjednotku g s vyznačenými primery pro amplifikaci 5'UTR a 3'UTR úseků.

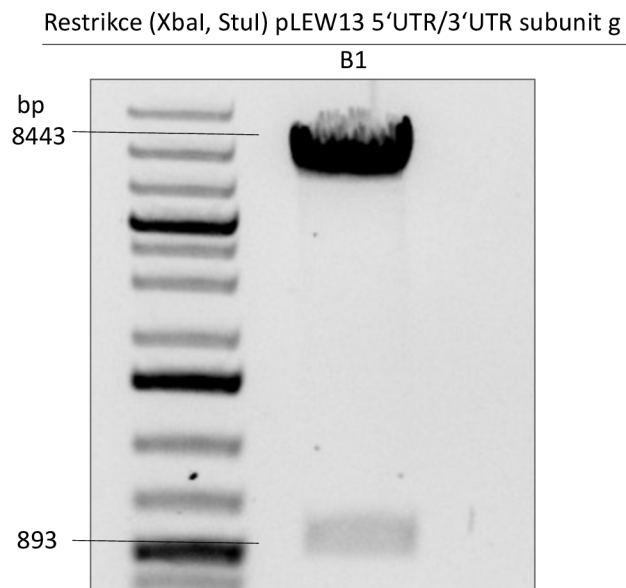
Po PCR byla namnožená a přečištěná DNA 5'UTR naštípána pomocí restrikčních enzymů NotI a MluI a zaligována do plasmidu pLEW13, který byl naštípán stejnými enzymy. Ligační směs byla zatransformována do bakterií *E.coli* a narostlé kolonie byly testovány pro správnost klonování a vytvoření plasmidu pLEW13 5'UTR. Plasmidová DNA vyizolována ze 7 bakteriálních kolonií byla naštípána pomocí restrikčních enzymů NotI a MluI a analyzována na 0,8% agarózovém gelu s očekávanými bandy o velikosti 8808 bp pro plasmid a 461 bp pro

včleněný inzert (Obr. 10). Tyto velikosti byly pozorovány u šesti ze sedmi vytvořených plasmidů. Plasmid A1 byl odeslán na sekvenování (firma Seqme s.r.o), kde došlo k potvrzení správného vložení 5'UTR. Plasmid A1 byl tedy použit i pro následující ligaci.



Obrázek 10: Agarózový gel zobrazuje vytvořené plasmidy obsahující pLEW13 5'UTR pro podjednotku g.

Do tohoto vytvořeného plasmidu A1 (pLEW13 5'UTR) byl následně vložen upravený 3'UTR úsek pomocí restrikčních enzymů XbaI a StuI, čímž došlo k vytvoření plasmidu pLEW13 5'UTR/3'UTR. Ligace v tomto případě byla méně efektivní, jelikož jsem získala pouze jednu kolonii. I tak jsem přistoupila k její validaci a vyizolovanou plasmidovou DNA jsem podrobila restrikční analýze pomocí enzymů XbaI a StuI. Výsledkem této restrikční analýzy byly dva bandy o očekávané velikosti 8443 bp pro plasmid a 893 bp pro včleněný inzert (Obr. 11). Následná sekvenční analýza plasmidu B1 potvrdila úspěšnost klonování a vytvoření první kazety pro delecí podjednotky g.

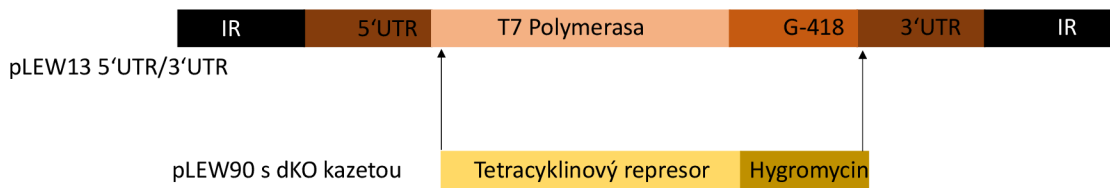


Obrázek 11: Agarózový gel zobrazující restrikci plasmidu pLEW13 5'UTR/3'UTR pro podjednotku g.

4.2. Příprava DNA kazety pro delecí druhé alely genu pro podjednotku g

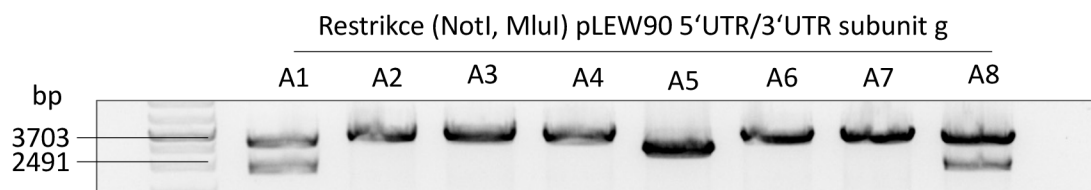
K vytvoření druhé kazety byl využit plasmid pLEW13 5'UTR/3'UTR (B1), u něhož došlo k výměně úseku obsahující T7 RNA polymerázu a rezistenci vůči G-418 za úsek obsahující selekční marker pro hygromycin a tetracyklinový represor.

Pro přípravu druhé kazety jsem využila plasmidu pLEW90, jenž obsahuje geny pro tetracyklinový represor a rezistenci vůči hygromycinu. Tento plasmid byl naštípán pomocí restrikčních enzymů XhoI a StuI. Plasmid pLEW13 5'UTR/3'UTR byl naštípán pomocí restrikčních enzymů XhoI, SmaI a BamHI. Do plasmidu pLEW13 5'UTR/3'UTR (klon B1) byla vkládána kazeta z plasmidu pLEW90, jak je zobrazeno na obrázku (Obr. 12). Ligační směs byla následně zatransformována do *E. coli*. Narostlé kolonie byly otestovány, zda došlo ke správnému vklonování a vytvoření plasmidu.



Obrázek 12: Vkládání plasmidu pLEW90 do pLEW13 5'UTR/3'UTR za účelem odstranění druhé alely pro podjednotku g.

Ligací došlo k vytvoření 8 bakteriálních kolonií. Z těchto kolonií byla vyizolována plasmidová DNA, která byla naštípána pomocí restričních enzymů NotI a MluI a analyzována na 0,8% agarózovém gelu. Byly očekávány bandy o velikosti 3703 bp pro plasmid a 2491 bp pro inzert (Obr. 13). Tyto velikosti byly získány u dvou klonů, A1 a A8. Klon A8 byl následně vybrán a odeslán na sekvenování, kde došlo k potvrzení správného vložení druhé kazety.



Obrázek 13: Agarózový gel zobrazující restrikci plasmidu pLEW90 5'UTR/3'UTR pro podjednotku g.

Tím došlo k vytvoření plasmidu pLEW90 5'UTR/3'UTR, jenž obsahuje tetracyklinový represor a rezistenci vůči hygromycinu.

Vytvořené kazety byly postupně transfekovány do linií *T. brucei* za účelem vytvoření sKO a následně dKO buněk.

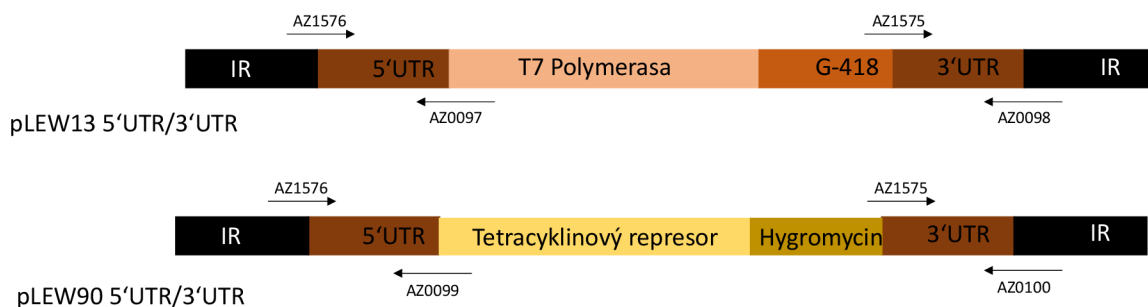
4.3. Úspěšné vytvoření dKO linií pro podjednotku g z WT buněk *T. brucei*

Ověřené plasmidy pLEW13 5'UTR/3'UTR a pLEW90 5'UTR/3'UTR byly linearizovány pomocí enzymu NotI a následně transfekovány do WT buněk *T. brucei*. První byl vložen

pLEW13 5'UTR/3'UTR a geneticky modifikované buňky byly selektovány pomocí antibiotika G-418. Selekční proces přežila pouze jedna stabilní linie, kterou jsem označila jako Sub g - sKO. Z časových důvodů nebyla tato linie validována ihned po svém vytvoření, ale ihned jsem přistoupila k další transfekci.

Do této linie byl pomocí další transfekce vložen plasmid pLEW90 5'UTR/3'UTR, linearizovaný pomocí enzymu NotI, za účelem vytvoření dKO buněk. Linie byly selektovány pomocí antibiotika hygromycin. Byly získány 4 stabilní linie (Sub g – dKO, A1, A2, A3 a A4).

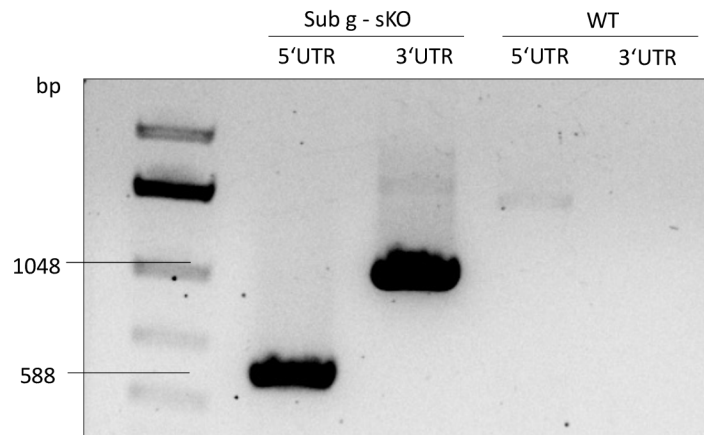
Správnost modifikace genomu *T. brucei* bylo potřeba ověřit. Ze všech linií a z WT buněk jsem izolovala gDNA, která byla podrobena PCR reakci pomocí specifických primerů (AZ1576 a AZ0097 pro ověření 5'UTR u sKO, AZ1575 a AZ0098 pro ověření 3'UTR u sKO. AZ1576 a AZ0099 pro ověření 5'UTR u dKO a AZ1575 a AZ0100 pro ověření 3'UTR u dKO) (Obr. 14) a analyzována na 0,8% agarózovém gelu.



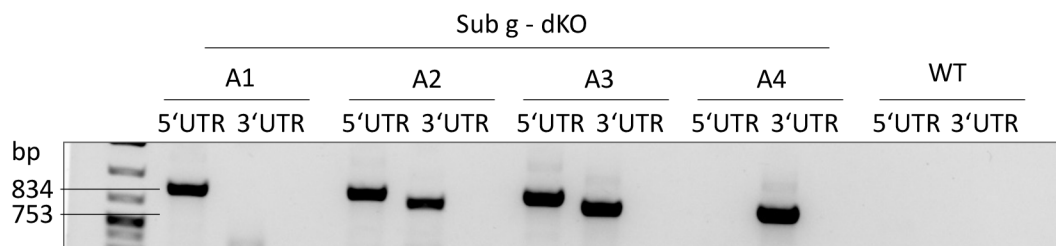
Obrázek 14: Plasmidy s vyznačenými primery, které byly využity pro ověření správného vytvoření buněčných linií.

U linií Sub g- sKO a Sub g – dKO bylo ověřováno správné vložení kazety se selekčním markerem, WT linie sloužila v obou případech jako negativní kontrola. Bylo očekáváno, že u Sub g – sKO bude pro 5'UTR přítomen band o velikosti 588 bp a pro 3'UTR band o velikost 1048 bp. WT byly použity jako negativní kontrola, tedy nebyl očekáván band ani pro jeden úsek. Toho bylo skutečně docíleno (Obr. 15), tedy bylo potvrzeno, že linie Sub g – sKO byla vytvořena úspěšně. U linie Sub g – dKO byl pro 5'UTR očekáván band o velikosti 834 bp a pro 3'UTR 753 bp. Každá linie musela obsahovat bandy o správné velikosti pro oba úseky. WT znovu sloužily jako

negativní kontrola, tedy nebyl žádoucí žádný band (Obr. 16). Ze 4 linií byly úspěšně vyhodnoceny pouze dva klony (A2 a A3).

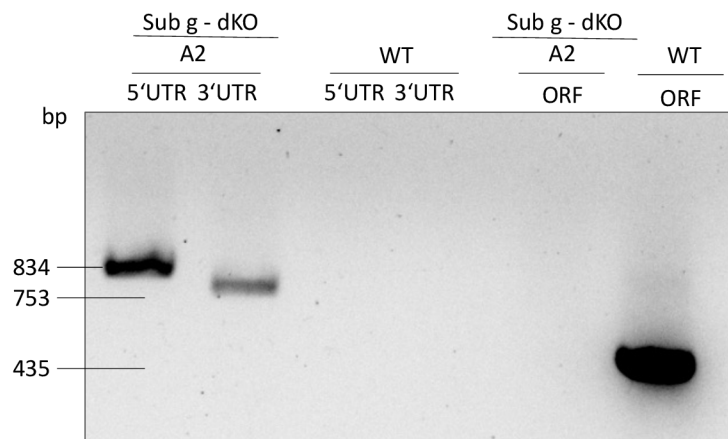


Obrázek 15: Agarózový gel s produkty PCR reakcí ověřující linii Sub g - sKO na 5'UTR a 3'UTR částech.

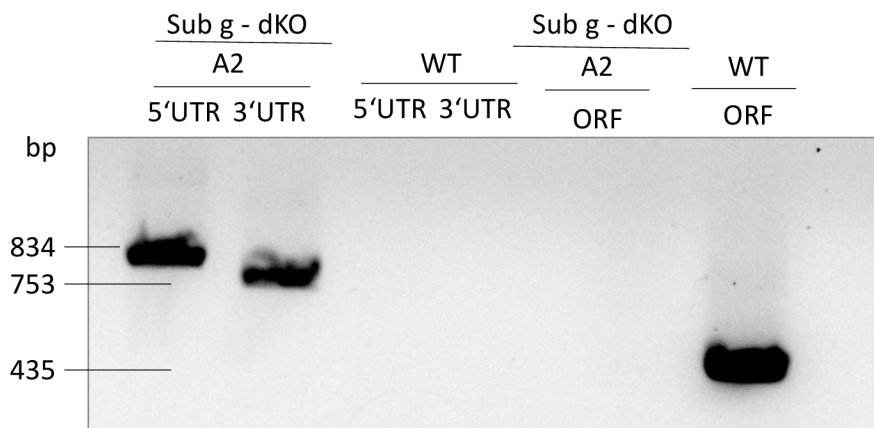


Obrázek 16: Agarózový gel s produkty PCR reakcí ověřující linii Sub g - dKO na 5'UTR a 3'UTR částech.

Ověřené linie Sub g – dKO A2 a A3 byly podrobené ještě jedné PCR, a to analýze genu čtecího rámce (open reading frame, ORF) pro podjednotku g, aby bylo ověřeno, že skutečně došlo k úplné delecii podjednotky g. V tomto případě WT linie sloužily jako pozitivní kontrola, kdy u WT linie se ORF pro podjednotku g vyskytuje. Kromě ORF jsem pro jistotu znovu amplifikovala i 5'UTR a 3'UTR úseky. Pro každý klon byl proveden samostatný gel (Obr. 17 a 18). Pro ověření 5'UTR a 3'UTR byl očekáván výsledek stejný jako je popsáno výše. Pro ORF sloužila WT linie jako pozitivní kontrola, tedy byl očekáván band o velikosti 435 bp. Tento band byl ovšem nežádoucí u linií Sub g – dKO. Absence ORF byla potvrzena u obou linií Sub g – dKO.



Obrázek 17: Agarózový gel s produkty PCR reakcí ověřující linii Sub g - dKO A2.



Obrázek 18: Agarózový gel s produkty PCR reakcí ověřující linii Sub g - dKO A3.

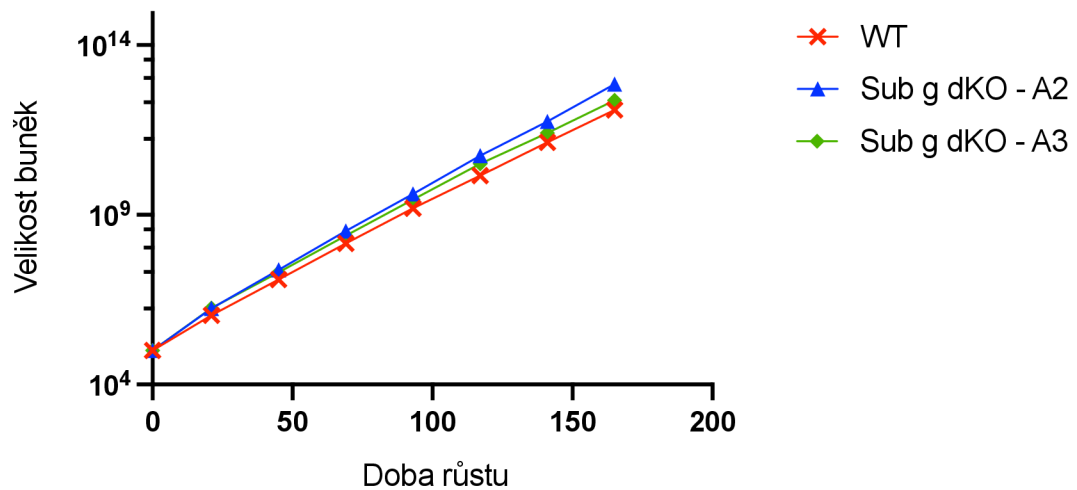
4.4. Ztráta podjednotky g nemá vliv na růst BSF *T. brucei*

Za účelem určení, zda ztráta podjednotky g má vliv na růst *T. brucei*, bylo provedeno zkoumání růstu u buněk Sub g- dKO (A2 a A3) v porovnání s WT buňkami. Růst byl zkoumán jak v médiu HMI-11 (Obr. 19) tak v médiu CMM (Obr. 20). Růst buněk jsem ve dvou odlišných médiích pozorovala kvůli tomu, že buňky se v odlišném médiu mohou chovat velmi odlišně, což je způsobeno odlišným množstvím glukózy, kdy v médiu CMM se nachází mnohem méně glukózy než v médiu HMI-11.

V médiu HMI-11 nebyla pozorována žádná změna v růstu Sub g – dKO A2 a A3 linií oproti WT buňkám. V médiu CMM se ukázal lehký odlišný růst u linie Sub g – dKO A2, ovšem s ohledem

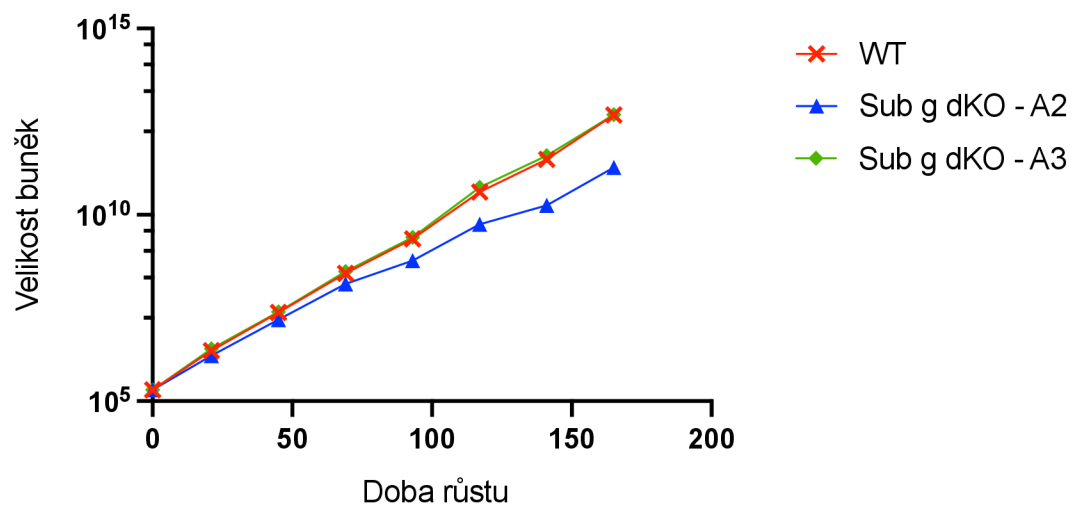
na to, že byl růst zkoumán pouze jednou, nelze z toho vyvodit žádný přímý výsledek. Naopak u Sub g – dKO A3 nedošlo k žádné změně v růstu.

Růst Sub g dKO in HMI-11



Obrázek 19: Sledování růstu buněk linie Sub g – dKO v porovnání s růstem WT buněk v médiu HMI-11.

Růst Sub g dKO in CMM

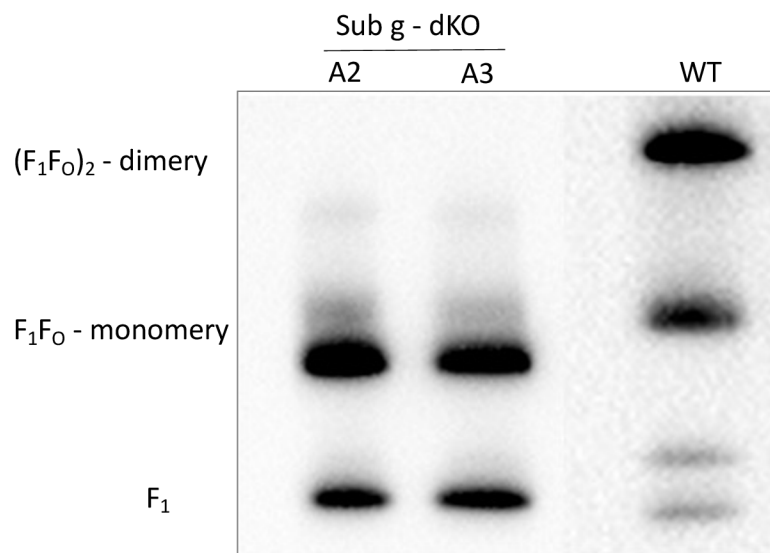


Obrázek 20: Sledování růstu buněk linie Sub g – dKO v porovnání s růstem WT buněk v médiu CMM.

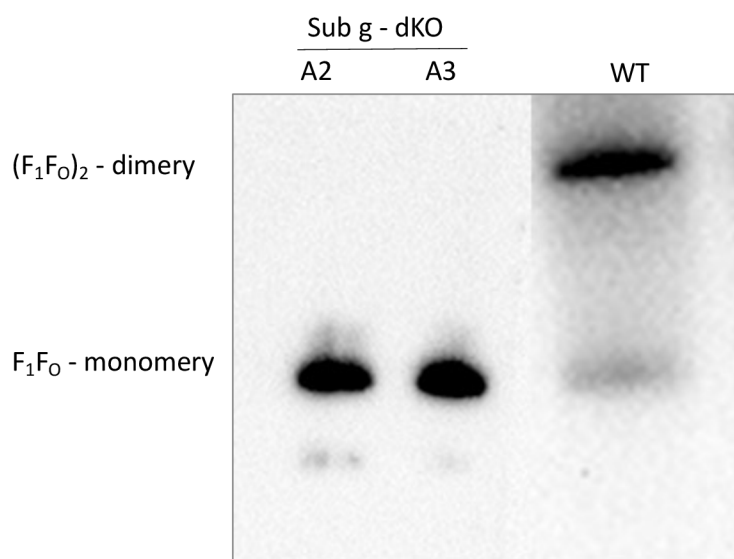
4.5. Ztráta dimerů způsobena absencí podjednotky g byla ověřena v nativním gelu

Sub g – dKO linie buněk byla otestována v nativním gelu za účelem ověření, že ztráta podjednotky g skutečně způsobila ztrátu dimerů ATP syntázy. Z linií Sub g – dKO (A2 a A3) byly izolovány mitochondrie, jež byly lyzovány pomocí DDM a následně byly mitochondriální lyzáty naneseny na polyakrylamidový gel NativePAGE. Pro porovnání výsledků byly mitochondriální lyzáty izolovány i z WT linií. Gel byl po elektroforéze zabudován do blotovacího sendviče a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Vizualizace komplexu ATP syntázy byla uskutečněna pomocí 3 odlišných protilátek (anti- β , anti-ATPaseTb2, anti-OSCP). Pro všechny tři protilátky byly očekávány bandy pro dimery a monomery. Pro protilátku anti- β byl kromě dimerů a monomerů očekáván také band pro podjednotku F_1 . U linií buněk Sub g – dKO byla předpokládána absence bandu pro dimery, kdežto u WT byla předpokládána detekce všech bandů (Obr. 21, 22 a 23).

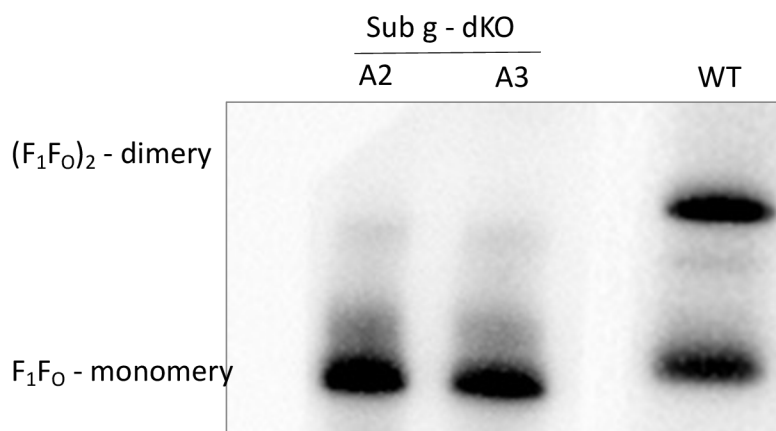
V porovnání s WT linií je zřejmé, že bandy, které signalizují dimery skutečně u linie Sub g - dKO chybí. Tedy bylo prokázáno, že delece genu pro podjednotku g skutečně způsobila destabilizaci dimerů a jejich ztrátu.



Obrázek 21: Nativní gel s linií Sub g – dKO (A2 a A3) v porovnání s nativním gelem WT linií. Prokazováno pomocí protilátky anti- β .



Obrázek 22: Nativní gel s linií Sub g – dKO (A2 a A3) v porovnání s nativním gelem WT linií. Prokazováno pomocí protilátky anti-OSCP.

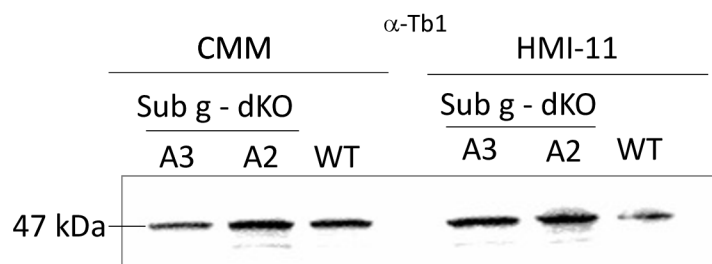


Obrázek 23: Nativní gel s linií Sub g – dKO (A2 a A3) v porovnání s nativním gelem WT linií. Prokazováno pomocí protilátky anti-ATPaseTb2.

4.6. Ztráta podjednotky g nemá vliv na stacionární hladinu dalších podjednotek F₀F₁ ATP syntázy

Za účelem zjištění, zda ztráta podjednotky g nějak ovlivnila hladinu jiných podjednotek ATP syntázy byla provedena SDS-PAGE s následným western blottingem a imunodetekcí. Lyzáty

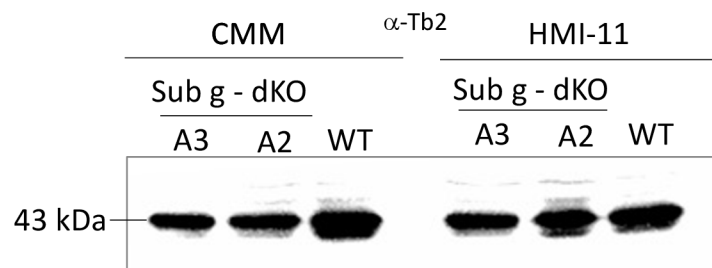
byly izolovány z linie Sub g – dKO (A2 a A3) a WT buněk ze dvou typů média, HMI-11 a CMM. Proteiny byly prokazovány pomocí protilátek anti-ATPaseTb1, anti-OSCP, anti-ATPaseTb2, anti-p18, anti-β (Obr. 24-28). Protilátky proti cytosolickému proteinu APRT (Obr. 30) a mitochondriálnímu Hsp70 (Obr. 29) sloužily jako kontrola pro porovnatelné nanesení buněčných lyzátů. Ani u jedné podjednotky v žádném médiu nebyla zaznamenána žádná změna v jeho produkci. Tedy delece podjednotky g nemá vliv na stálý stav (steady-state levels) ostatních podjednotek ATP syntázy v buňce.



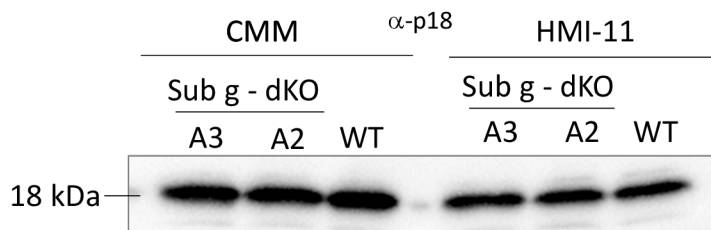
Obrázek 24: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-Tb1.



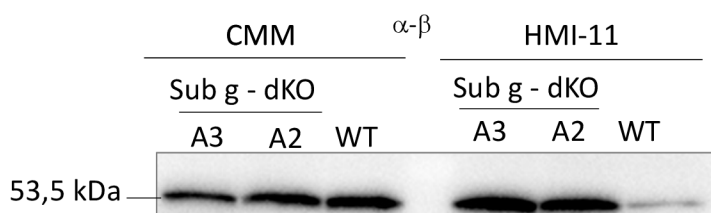
Obrázek 25: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-OSCP.



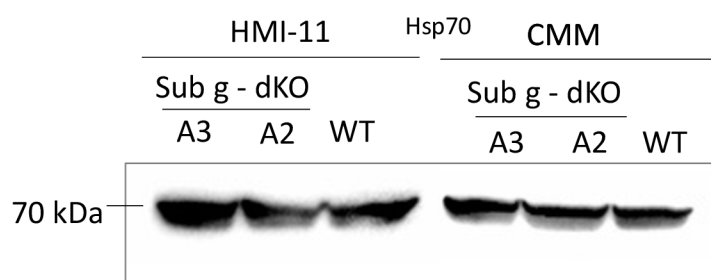
Obrázek 26: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-ATPaseTb2.



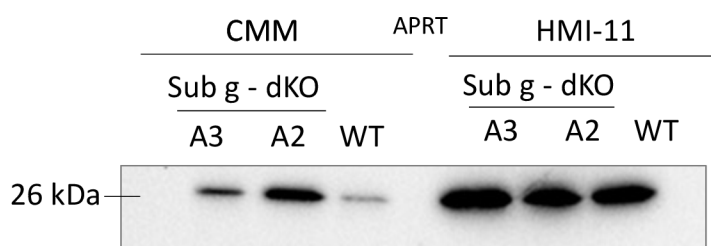
Obrázek 27: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-p18.



Obrázek 28: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti- β .



Obrázek 29: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-Hsp70.

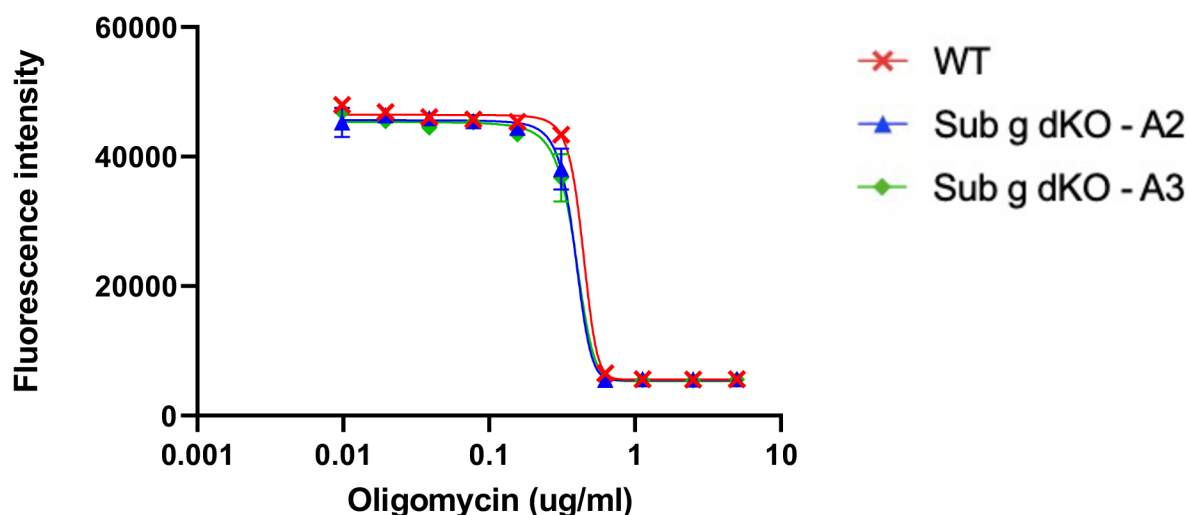


Obrázek 30: Gel zobrazující množství proteinu, prokazováno pomocí protilátky anti-APRT.

4.7. U linií s absencí podjednotky g nebyla pozorována snížená tolerance na oligomycin

Po ověření ztráty dimerů v nativním gelu jsem otestovala u buněk linie Sub g – dKO toleranci na oligomycin. Oligomycin je inhibitor ATP syntázy, který se naváže na proteinové rozhraní mezi podjednotkou a a c-kroužkem, a tím znemožní průchod protonů skrz kanál v ATP syntáze. Senzitivita na oligomycin se dá využít i k určení hladiny $\Delta\Psi_m$, který je vytvářen právě pomocí ATP syntázy a její reverzní aktivitou u BSF. Pokud by absence podjednotky g ovlivňovala výšku $\Delta\Psi_m$, tedy v případě, kdy by byl nižší, buňky *T. brucei* by byly více senzitivní na oligomycin. To by znamenalo, že ztráta dimerů ovlivňuje aktivitu ATP syntáz a tím pádem také $\Delta\Psi_m$.

Za tímto účelem byla provedena Alamar blue assay. Byla provedena na buňkách Sub g – dKO (A2 a A3) a na kontrolních WT buňkách (Obr. 31). Po analýze výsledků bylo prokázáno, že ztráta podjednotky g nemá vliv na senzitivitu na oligomycin. Tedy ztráta dimerů nemá nejspíše vliv na schopnost ATP syntázy pumpovat protony z jedné strany membrány na druhou. Také to signalizuje, že monomery u Sub g – dKO linií jsou schopny vytvářet $\Delta\Psi_m$ stejně dobře, jako dimery přítomné u WT buněk.



Obrázek 31: Senzitivita na oligomycin analyzována pomocí Alamar blue assay u buněčných linií Sub g – dKO a WT.

5. Diskuze

T. brucei má velmi složitý životní cyklus během kterého prochází mnoha morfologickými i metabolickými změnami. Dochází ke střídání PCF a BSF, mezi kterými se nachází velmi zřejmé a zásadní rozdíly (Hellemond et al, 2005). Právě tato rozdílnost činí z *T. brucei* velmi zajímavý modelový organismus. V této práci nás především zajímala mitochondrie tohoto parazita. V PCF se nacházejí mitochondrie, které obsahují velké množství krist, což je nejspíše způsobeno tím, že ATP si tato forma generuje především pomocí OXPHOS. Naopak, BSF, u nichž se OXPHOS nenachází a ATP získávají z procesu glykolýzy, dochází k velké, téměř až absolutní, ztrátě krist (Zíková 2022).

Největší podíl na utváření krist má nejspíše ATP syntáza. Kdy ATP syntáza, nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně se formuje do dimerů a tím nejspíše napomáhá utváření krist, protože tyto dimery následně způsobí postupnou invaginaci mitochondriální membrány, což vede k formování krist. Za stabilitu dimerů je s největší pravděpodobností zodpovědná podjednotka g (Anselmi et al, 2018). Právě pro svou funkci při utváření dimerů jsme se rozhodli vytvořit dKO buněčné linie BSF *T. brucei* pro podjednotku g. Cílem bylo vytvoření buněk, u kterých budou odstraněny obě alely pro podjednotku g a tím dojde ke ztrátě dimerů. Toho bylo opravdu docíleno a byly vytvořeny dvě buněčné linie s celkovou absencí podjednotky g (Sub g dKO – A2 a A3), které byly ověřeny pomocí metody PCR (Obr. 17 a 18), která potvrdila úspěšné vytvoření linií.

U linií také bylo potřeba ověřit, zda se u nich nacházejí či nenacházejí dimery. To bylo ověřeno pomocí metody BN-PAGE (Obr. 21, 22 a 23), kdy bylo potvrzeno, že absence podjednotky g zapříčinila i ztrátu dimerů. U dKO buněčné linie se nacházely pouze monomery. Tím bylo potvrzeno, že linie byly vytvořeny správně a mohlo se s nimi přejít k dalším experimentům.

Pokud došlo k odstranění podjednotky g u jiného modelového organismu, například u kvasinek nebo savčích buněk, došlo k utvoření specifických tzv. cibulovitých krist (Paumard et al, 2002). Tyto kristy ale bylo schopné identifikovat pouze pomocí metod elektronové mikroskopie, což u mé buněčné linie nebylo zatím provedeno, ale určitě se k tomuto kroku ještě v budoucnu přistoupí.

Při odstranění podjednotky g u PCF *T. brucei*, která na rozdíl od BSF má v mitochondriích přítomné krysty a zdrojem ATP je OXPHOS, byl pozorován růstový fenotyp. Toto pozorování proběhlo ve dvou odlišných médiích, kdy první bylo bohaté na glukózu a druhé bylo na glukózu chudší. V případě prvního média nebyl u PCF pozorován žádný rozdíl v růstu oproti WT buňkám. Změna ale nastala v druhém médiu, ve kterém došlo ke zpomalení růstu až o 50 %. To je nejspíše způsobeno tím, že v médiu bohatém na glukózu buňka využívá k získávání ATP proces glykolýzy a mitochondriální substrátové fosforylace. Ovšem, v médiu, kde není glukóza a je přítomen pouze prolin, je parazit zcela odkázán na OXPHOS, který ale není z důvodu absence dimerů tolik účinný jako u WT buněčné linie. Tedy, lze předpokládat, že dimerizace ATP syntázy je klíčová pouze v případě, kdy je většina ATP generována pomocí OXPHOS (Gahura et al, 2022).

Ovšem, u BSF je celková absence OXPHOS i u WT buněk. Z tohoto důvodu nebyl pozorován odlišný růstový fenotyp u buněk linie Sub g – dKO A2 a A3 v porovnání s WT. Růst byl pozorován také ve dvou médiích s odlišným množstvím glukózy (Obr. 19 a 20). Z výsledků je zřejmé, že ani u jedné linie, ani v jednom médiu, nedošlo k markantní změně v růstu. Tedy, buňka je schopna přežít pouze s monomery. Z toho lze usuzovat, že monomery jsou buď schopné generovat stejné množství $\Delta\Psi_m$ anebo ho generují méně, ale na buňku to nemá vliv. Tato otázka byla vyřešena jiným členem laboratoře, který na buňkách provedl měření $\Delta\Psi_m$ a prokázalo se, že je jeho hladina u dKO linií stejná, jako u WT buněk (díky patří Michaele Husové). Což znamená, že monomery jsou stejně aktivní jako dimery. Tedy, dimerizace nemá vliv na aktivitu a pomocí dalších experimentů bude možno usoudit, zda je důležitá pouze pro biogenezi krist.

Schopnost monomerů fungovat na stejné úrovni jako dimery bylo také nepřímo potvrzeno pomocí mého experimentu, kdy byly dKO linie testovány na senzitivitu na oligomycin a ta se nelišila od WT linií.

Zajímavou otázkou zůstává, zda-li mnou generované dKO buňky budou schopny se diferenciovat do PCF, s ohledem na to, že PCF jsou na ztrátu podjednotky g v určitých podmínkách citlivější. Další zajímavou otázkou je, zda budou dKO linie virulentní in vivo v

myším modelu. Veškeré tyto otázky budou předmětem dalšího zkoumání a dKO linie tedy budou dále používány pro další experimenty jinými členy laboratoře.

6. Závěr

Účelem této práce bylo vytvořit buněčné linie *T. brucei* s absencí podjednotky g ATP syntázy. Tyto linie byly vytvořeny a následně ověřeny pomocí metody PCR a metodou BN-PAGE, která poukázala na specifickou ztrátu dimerů ATP syntázy.

Linie byly následně použity pro další experimenty, aby byla pochopena důležitost podjednotky g pro stabilitu dimerů ATP syntázu a pro biologii krevního stádia *T. brucei*. Analýza rychlosti růstu buněk ukázala, že delece genu pro podjednotku g nemá na tento parametr žádný vliv. Pomocí testu senzitivity na oligomycin, u kterého také nebyla detekována žádná změna, jsme nepřímo ukázali, že u daných linií nejspíše nedochází ke snížení $\Delta\Psi_m$.

Mnou vytvořené linie s absencí podjednotky g budou v budoucnu využity k dalším experimentům a stanou se nástrojem pro studium důležitosti dimerů pro BSF savčího parazita *T. brucei*.

7. Reference

Alencar, M. B., Ramos, E. V., Silber, A. M., Zíková, A., & Oliveira, M. F. The extraordinary energy metabolism of the bloodstream *Trypanosoma brucei* forms: a critical review and hypothesis.

Anand, R., Reichert, A. S., & Kondadi, A. K. (2021). Emerging roles of the MICOS complex in cristae dynamics and biogenesis. *Biology*, 10(7), 600.

Anselmi, C., Davies, K. M., & Faraldo-Gómez, J. D. (2018). Mitochondrial ATP synthase dimers spontaneously associate due to a long-range membrane-induced force. *Journal of General Physiology*, 150(5), 763-770.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., & Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *The EMBO journal*, 17(24), 7170-7178.

Bílý, T., Sheikh, S., Mallet, A., Bastin, P., Pérez-Morga, D., Lukes, J., & Hashimi, H. (2021). Ultrastructural changes of the mitochondrion during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 68(3), e12846.

Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., & Sabatini, D. M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*, 162(3), 540–551.

Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., & Kühlbrandt, W. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4250-4255.

Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13990-13998.

Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(3), 429-453.

Creek, D. J., Nijagal, B., Kim, D. H., Rojas, F., Matthews, K. R., & Barrett, M. P. (2013). Metabolomics guides rational development of a simplified cell culture medium for drug screening against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2768–2779

Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D., & Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13602-13607.

Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., ... & Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14121-14126.

Deeks, E. D. (2019). Fexinidazole: first global approval. *Drugs*, 79, 215-220.

Dewar, C. E., Oeljeklaus, S., Wenger, C., Warscheid, B., & Schneider, A. (2022). Characterization of a highly diverged mitochondrial ATP synthase Fo subunit in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 298(4).

Favaro, A., Bolcato, G., Comini, M. A., Moro, S., Bellanda, M., & Sturlese, M. (2023). Drugging the Undruggable *Trypanosoma brucei* Monothiol Glutaredoxin 1. *Molecules*, 28(3), 1276.

Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7), 319-324.

Gahura, O., Hierro-Yap, C., & Zíková, A. (2021). Redesigned and reversed: Architectural and functional oddities of the trypanosomal ATP synthase. *Parasitology*, 148(10), 1151-1160.

Gahura, O., Mühleip, A., Hierro-Yap, C., Panicucci, B., Jain, M., Hollaus, D., Slapničková, M., Zíková, A., & Amunts, A. (2022). An ancestral interaction module promotes oligomerization in divergent mitochondrial ATP synthases. *Nature communications*, 13(1), 5989.

Garcés, E., & Hoppenrath, M. (2010). Ultrastructure of the intracellular parasite *Parvilucifera sinerae* (Alveolata, Myzozoa) infecting the marine toxic planktonic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 10(1), 64-70.

Grover, G. J., & Malm, J. (2008). Pharmacological profile of the selective mitochondrial F1F0 ATP hydrolase inhibitor BMS-199264 in myocardial ischemia. *Cardiovascular therapeutics*, 26(4), 287-296.

Hierro-Yap, C., 2021: Bioenergetic studies in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*: functional characterisation of the mitochondrial FoF1-ATP synthase/ATPase complex. Ph.D. thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 173 pp.

Chinopoulos, C., & Adam-Vizi, V. (2010). Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 221-227.

Chinopoulos, C. (2011). Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS letters*, 585(9), 1255-1259.

Javadov, S., & Kuznetsov, A. V. (2013). Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress. *Frontiers in Physiology*, 4, 207.

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.

Kabani, S., Fenn, K., Ross, A., Ivens, A., Smith, T. K., Ghazal, P., & Matthews, K. (2009). Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC genomics*, 10, 1-24.

Kaurov, I., Vancová, M., Schimanski, B., Cadena, L. R., Heller, J., Bílý, T., ... & Hashimi, H. (2018). The diverged trypanosome MICOS complex as a hub for mitochondrial cristae shaping and protein import. *Current Biology*, 28(21), 3393-3407.

Khakh, B. S., & Burnstock, G. (2009). The double life of ATP. *Scientific American*, 301(6), 84–92.

Kühlbrandt W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual review of biochemistry*, 88, 515–549.

Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*, 24(10), 800-808.

Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science*, 118(2), 283-290.

Mühleip, A. W., Dewar, C. E., Schnauffer, A., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2017). In situ structure of trypanosomal ATP synthase dimer reveals a unique arrangement of catalytic subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 992-997.

Mühleip, A. W., Joos, F., Wigge, C., Frangakis, A. S., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2016). Helical arrays of U-shaped ATP synthase dimers form tubular cristae in ciliate mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), 8442–8447.

Muñoz-Gómez, S. A., Slamovits, C. H., Dacks, J. B., Baier, K. A., Spencer, K. D., & Wideman, J. G. (2015). Ancient homology of the mitochondrial contact site and cristae organizing system points to an endosymbiotic origin of mitochondrial cristae. *Current Biology*, 25(11), 1489-1495.

Nelson, N., & Ben-Shem, A. (2004). The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(12), 971–982.

Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., & Pagliarani, A. (2015). Opposite rotation directions in the synthesis and hydrolysis of ATP by the ATP synthase: hints from a subunit asymmetry. *The Journal of membrane biology*, 248, 163-169.

Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP synthase: structure, function and inhibition. *Biomolecular concepts*, 10(1), 1-10.

Nicholls, D. G., & Budd, S. L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiological reviews*, 80(1), 315-360.

Pánek, T., Eliáš, M., Vancová, M., Lukeš, J., & Hashimi, H. (2020). Returning to the fold for lessons in mitochondrial crista diversity and evolution. *Current Biology*, 30(10), R575-R588.

Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., ... & Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO journal*, 21(3), 221-230.

Seravin L. N. (1993). Osnovnye tipy i formy tonkogo stroeniia krist mitokhondrii: stepen' ikh évoliutsionnoï stabil'nosti (sposobnost' k morfologicheskim transformatsiiam) [The basic types and forms of the fine structure of mitochondrial cristae: the degree of their evolutionary stability (capacity for morphological transformations)]. *Tsitologiya*, 35(4), 3–34.

Silvester, E., McWilliam, K. R., & Matthews, K. R. (2017). The cytological events and molecular control of life cycle development of *Trypanosoma brucei* in the mammalian bloodstream. *Pathogens*, 6(3), 29.

Sinha, S. D., & Wideman, J. G. (2022). The persistent homology of mitochondrial ATP synthases. *bioRxiv*, 2022-09.

Sobti, M., Smits, C., Wong, A. S., Ishmukhametov, R., Stock, D., Sandin, S., & Stewart, A. G. (2016). Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states. *Elife*, 5, e21598.

Song, J., Pfanner, N., & Becker, T. (2018). Assembling the mitochondrial ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(12), 2850-2852.

van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R., & Tielens, A. G. M. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions*, 33(5), 967-971.

Vázquez-Acevedo, M., Vega-deLuna, F., Sánchez-Vásquez, L., Colina-Tenorio, L., Remacle, C., Cardol, P., ... & González-Halphen, D. (2016). Dissecting the peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1183-1190.

Walker, J. E. (2012). The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *BBA-Bioenergetics*, (1817), S1.

Wilkens, V., Kohl, W., & Busch, K. (2013). Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *Journal of cell science*, 126(1), 103-116.

Zíková, A. (2022). Mitochondrial adaptations throughout the *Trypanosoma brucei* life cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(6), e12911.