Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Různé metodické přístupy za účelem snížení exprese podjednotek komplexu I u hmyzích forem *Trypanosoma brucei*

Diplomová práce

Bc. Barbora Heroutová

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

Školitel-specialista: Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Bibliografická citace

Heroutová B. (2022). Různé metodické přístupy za účelem snížení exprese podjednotek komplexu I u hmyzích forem *Trypanosoma brucei.* [Various approaches to eliminate expression of complex I subunits in procyclic *Trypanosoma brucei*. Mgr. Thesis, in Czech] – 57 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace

Complex I (NADH:ubiquinone dehydrogenase) is the largest protein complex of the mitochondrial electron transport chain, but its presence and activity are not essential for the growth of two life cycle stages of *Trypanosoma brucei*. Here, we implemented various genetic methods to generate *T. brucei* cell lines that will lack or will have decreased levels of this complex. The methodological approaches included i) RNA interference of NDUFA6, a subunit predicted to be essential for the structural integrity, and of NUBM, a subunit essential for the complex I activity; ii) generation of double knock-out of NDUFA6 using CRISPR/Cas9; iii) generation of double knock-out of NUBM using homology replacement. These generated tools will help us to elucidate if this highly conserved complex is essential for other life cycle stages of this medically important parasite.

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

V Českých Budějovicích dne 13.4.2022 …….

Barbora Heroutová

Poděkování

Největší dík patří mým školitelkám Alče Zíkové a Evče Doleželové za důvěru, odborné a vstřícné vedení a trpělivost. Dále musím poděkovat Míše Kunzové za neúnavnou snahu vštípit mi nejen biologické vědomosti ale i elementární znalosti matematiky. Míše Husové a Martince Slapničkové děkuji za morální podporu a pohotové rady v krizových situacích. A také děkuji celému AZ týmu za skvělé prostředí, ve kterém jsem měla možnost pracovat. Mým rodičům i ostatním členům rodiny a přátelům děkuji za veškerou jejich podporu a důvěru.

Obsah

1. Úvod 1

1.1 Životní cyklus *Trypanosoma brucei* 1

1.2 Komplex I NADH:ubichinon dehydrogenáza 3

1.3 Komplex I u *Trypanosoma brucei* 6

1.4 Metabolické adaptace v životním cyklu *Trypanosoma brucei* 10

2. Cíle práce 12

3. Metody 13

3.1 Linie *Trypanosoma brucei* 13

3.2 Vytvoření geneticky modifikovaných linií *Trypanosoma brucei* 14

3.2.1 Příprava vektorů umožňující expresi vlásenkové dvouvláknové RNA cílené na NDUFA6 a NUBM podjednotky 14

3.2.2 Příprava vektorů umožňující expresi dvouvláknové RNA pomocí head-to-head promotorů cílené na NUBM podjednotku 17

3.2.3 Ověření RNAi linií pomocí western blotu 18

3.2.4 Vytvoření knock-outu pro NDUFA6 pomocí transientní CRISPR/Cas9 metody 20

3.2.5 Knock-out obou alel genu NUBM pomocí homologní rekombinace 25

3.2.6 Transfekce vytvořených vektorů do linií *Trypanosoma brucei* 28

3.3 Růstové křivky 29

3.4 Nativní proteinová elektroforéza a aktivita proteinů 29

3.5 Alamar blue assay 31

4. Výsledky 32

4.1 CRISPR/Cas9 knock-out podjednotky NDUFA6 v RBP6$^{O/E}$ linii nebyl úspěšný 32

4.2 Vytvoření linií s RNAi podjednotky NDUFA6 na pozadí 29-13 využitím vektoru pTrypson, ale selhání přístupu na pozadí RBP6$^{O/E}$ 34

4.3 Snížení exprese NDUFA6 podjednotky nemá vliv na NADH dehydrogenázovou aktivitu detekovanou pomocí nativní elektroforézy 38

4.4 Senzitivita na rotenon není při deleci NDUFA6 podjednotky zvýšená 39

4.5 Úspěšná delece jedné alely genu NUBM v divoké linii Lister 427 41

4.6 RNA interference NUBM podjednotky pomocí pTrypson vektoru se nezdařila 42

4.7 Snížení hladiny podjednotky NUBM pomocí RNAi s použitím p2T7-177 vektoru na pozadí 29-13_NUBM^{V5tag} linie 43

4.8 NADH dehydrogenázová aktivita komplexu I v nativním gelu není průkazná 44

5. Diskuse 46

6. Závěr 51

7. Reference 52

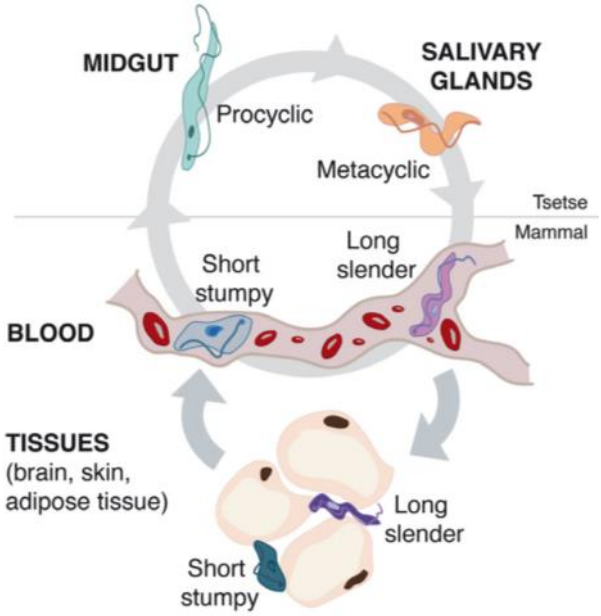
1. Úvod

1.1 Životní cyklus *Trypanosoma brucei*

T. brucei je extracelulární parazitický prvok, který je původcem spavé nemoci u lidí a u zvířat způsobuje nemoc nazývanou nagana. Jeho přenašečem je moucha tse-tse a hlavním hostitelem jsou savci. Onemocnění u dobytka je v Africe velkým ekonomickým problémem znemožňujícím produkci mléka a masa. V případě spavé nemoci se jedná o poddruhy *T. brucei gambiense* a *T. brucei rhodesiense*. Kolonizuje v krvi a intersticiálních prostorech v tukových tkáních, kůži i mozku. Ke kolonizaci mozku dochází v pozdějších stádiích onemocnění a projevuje se charakteristickými symptomy jako je únava a neurologické problémy (Franco, Simarro, Diarra, & Jannin, 2014). Nejlépe a nejčastěji zkoumaným poddruhem je *T. brucei brucei*, který napadá hovězí dobytek a skot a je neinfekční pro člověka (Smith, Bringaud, Nolan, & Figueiredo, 2017).

Savce a mouchu tse-tse obývají různá stádia (Obr. 1). V krevním oběhů savců se vyskytují dvě hlavní krevní formy – dlouhá štíhlá a krátká zavalitá. Dlouhá štíhlá krevní forma podstupuje binární dělení asi třikrát denně, zatímco krátká zavalitá forma je ve stádiu zastaveného buněčného cyklu ve fázi G1/G0 a spolu s krví ji nasaje moucha při krmení (MacGregor & Matthews, 2010; Smith et al., 2017). V mouše se krevní krátká forma diferencuje na procyklické stádium, které žije ve středním střevě mouchy tse-tse. Procyklické stádium proliferuje méně často než krevní forma, přibližně dvakrát denně. Po migraci do proventrikula následuje diferenciace v epimastigota a nakonec v metacyklika ve slinných žlázách. Metacyklici nepodstupují dělení a zajišťují reinfekci savce během nasávání krve mouchou (Smith, Bringaud, Nolan, & Figueiredo, 2017).

Nejlépe prostudovaná jsou stádia schopná buněčného dělení, kterými jsou procyklické stádium žijící v mouše a dlouhé štíhlé stádium žijící v krvi savců. Významné rozdíly mezi těmito stádii jsou v mitochondriálním metabolismu. Procyklické stádium má aktivní mitochondriální enzymy elektronového transportního řetězce (komplexy I, II, III a IV) k produkci ATP využívá oxidativní fosforylaci na komplexu V (F_1F_O ATP syntáza) (Acestor et al., 2011). Zatímco krevní forma závisí na glykolýze a komplexy III a IV nemá. Velice zajímavým faktem je, že komplex I je přítomen v buňkách procyklického i krevního stádia, ale je zřejmé že ani pro jedno z těchto stádií není komplex I esenciální a jeho funkce zůstává neobjasněná (Surve, Heestand, Panicucci, Schnaufer, & Parsons, 2012; Verner et al., 2011).



Obr. 1: Schéma životního cyklu T. brucei (Smith, Bringaud, Nolan, & Figueiredo, 2017).

1.2 Komplex I NADH:ubichinon dehydrogenáza

Komplex I, který má u savců velikost přibližně 1MDa, je největším enzymem elektronového transportního řetězce, ve kterém představuje jedno z několika vstupních míst elektronů. Přenos elektronů probíhá na základě rozdílů redoxních potenciálů jednotlivých podjednotek a finálního akceptoru elektronů, ubichinonu. Elektrony jsou na komplex I předávány oxidací koenzymu NADH, který má nejnižší redoxní potenciál. Elektrony jsou v komplexu I akceptovány na flavinmononukleotid (FMN) kofaktoru a přeneseny přes sedm FeS center na ubichinon, čímž dochází k postupnému uvolňování energie a ubichinon je redukován. Ubichinon je mobilní přenašeč, který elektrony transportuje z komplexu I na komplex III. Z komplexu III jsou elektrony transportovány cytochromem c na komplex IV. Redoxní potenciál enzymů v řetězci se postupně zvyšuje a nejvyšší potenciál má kyslík, který přijímá elektrony od komplexu IV a který je výstupním místem elektronů z řetězce. Během transportu elektronů řetězcem dochází k uvolnění potenciální energie, která je komplexy I, III a IV využita k pumpování protonů proti koncentračnímu gradientu přes membránu mitochondrie do mezimembránového prostoru a vytvoření elektrochemického gradientu (Δ p). Komplex I využívá energii toku elektronů k přenosu 4 protonů přes vnitřní membránu mitochondrie. Síla elektrochemického gradientu nakonec slouží k produkci ATP komplexem V (ATP syntázou) při oxidativní fosforylaci (Mitchell & Moyle, 1967).

Struktura komplexu I má tvar písmene L a skládá se ze dvou domén – hydrofilní rameno zajišťující oxidaci NADH a hydrofobní rameno translokující protony, které je zanořené v membráně. Eukaryotický komplex I je tvořen 46 podjednotkami, z nichž 14 tvoří jádro komplexu. Podjednotky hydrofobního ramene, kterých je celkem 7, jsou u eukaryot kódovány v mitochondrii. V jádře jsou kódovány podjednotky hydrofilního ramene, které obsahují NADH vazebné místo, FMN kofaktor nebo FeS klastr. Ostatní podjednotky jsou tzv. doplňkové a funkce velké části těchto podjednotek není známa (Brandt, 2006).

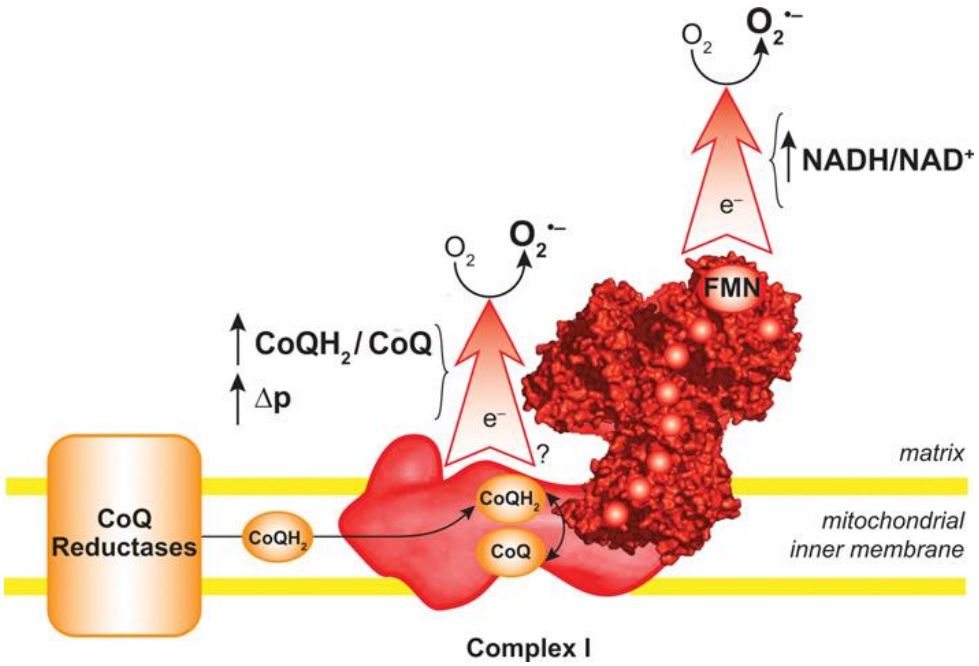
S komplexem I úzce souvisí produkce volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS). Jsou to vysoce reaktivní a nestabilní molekuly způsobující poškození DNA, proteinů i lipidů, čímž dochází k poškození membrán a jsou známé svojí škodlivostí pro organismus, kdy jsou příčinou oxidativního stresu (Murphy, 2009). Superoxid (O_2^-) je volný kyslíkový radikál vznikající při reakci kyslíku s jedním elektronem a po jeho vzniku je rychle přeměněn na stabilnější H_2O_2 enzymem superoxid dismutázou. Za jedno z nejdůležitějších míst vzniku superoxidu v mitochondrii je považován komplex I (Murphy, 2009).

Jsou známy dva mechanismy vzniku superoxidu na komplexu I. První je přímo spojen s oxidací NADH a je nazýván jako „vpřed směřující transport elektronů“ (forward electron transport). Jeden elektron je předáván na kyslík z plně redukovaného flavinu při nadbytku NADH a míra produkce superoxidu je ovlivněna poměrem koncentrací NAD^+ a NADH (Kussmaul & Hirst, 2006) Druhý proces, při kterém v mitochondrii vznikají kyslíkové radikály, je reverzní elektronový transport (RET) (Obr. 2). RET je důsledek omezené redoxní kapacity ubichinonu a vysokého Δ p (vysoký membránový potenciál a rozdíl pH přes membránu). K této situaci může dojít při vysoké koncentraci sukcinátu, který je oxidován na komplexu II a komplex II dále předává elektrony na ubichinon. Superoxid je při RET buď vytvářen flavinem stejně jako při vpřed směřujícím transportu elektronů anebo vzniká v místě vazby ubichinonu na komplex I. Při RET jsou elektrony v řetězci tlačeny opačným směrem přes komplex I za současného pumpování protonů dovnitř mitochondrie, vzniku NADH z NAD^+ a také superoxidu jako výsledek reakce redukovaného flavinu s kyslíkem (Pryde & Hirst, 2011). RET je patofyziologický jev způsobující v organismu oxidativní poškození, které způsobuje například ischemické poškození tkání (Chouchani et al., 2016). Zajímavou skutečností je, že i v případě vysoké aktivity RET nedochází k utlumení elektronového transportního řetězce a membránový potenciál je stále spřažen s produkcí ATP oxidativní fosforylací (Pryde & Hirst, 2011).

V poslední době se stále častěji ukazuje, že buňka ROS využívá jako signalizační molekuly. Molekula superoxidu je rychle konvertována na peroxid vodíku enzymem superoxid dismutázou. Peroxid vodíku může prostupovat membránou, na rozdíl od superoxidu, a může tak být buňkou využíván jako signální molekula. Funkce ROS při buněčné signalizaci byla dokázána již v několika případech. Jedním z nich je stav hypoxie, kdy se buňka musí přizpůsobit na nedostatek kyslíku. Paradoxně právě snížená dostupnost kyslíku vede v mitochondrii k vyšší produkci ROS, které pak signalizují v procesech adaptujících buňku na hypoxické podmínky (Chandel et al., 1998). Zvýšenou koncentrací ROS molekul se vyznačují také onkogenní buňky. Volné kyslíkové radikály v onkogenních buňkách způsobují poškození DNA a zároveň jsou využívány k signalizaci, čímž aktivují další proliferační cesty a umožňují takové buňce přežít (Hamanaka & Chandel, 2010).

RET je ale také buňkou využívaný fyziologický proces sloužící k redoxní signalizaci. RET je závislý na Δ p, který přímo souvisí s produkcí ATP a také na redoxním stavu ubichinonu, jež odráží množství elektronů vstupujících do respiračního řetězce. Díky tomu je RET citlivým nástrojem, který může okamžitě odpovídat na změny v důležitých

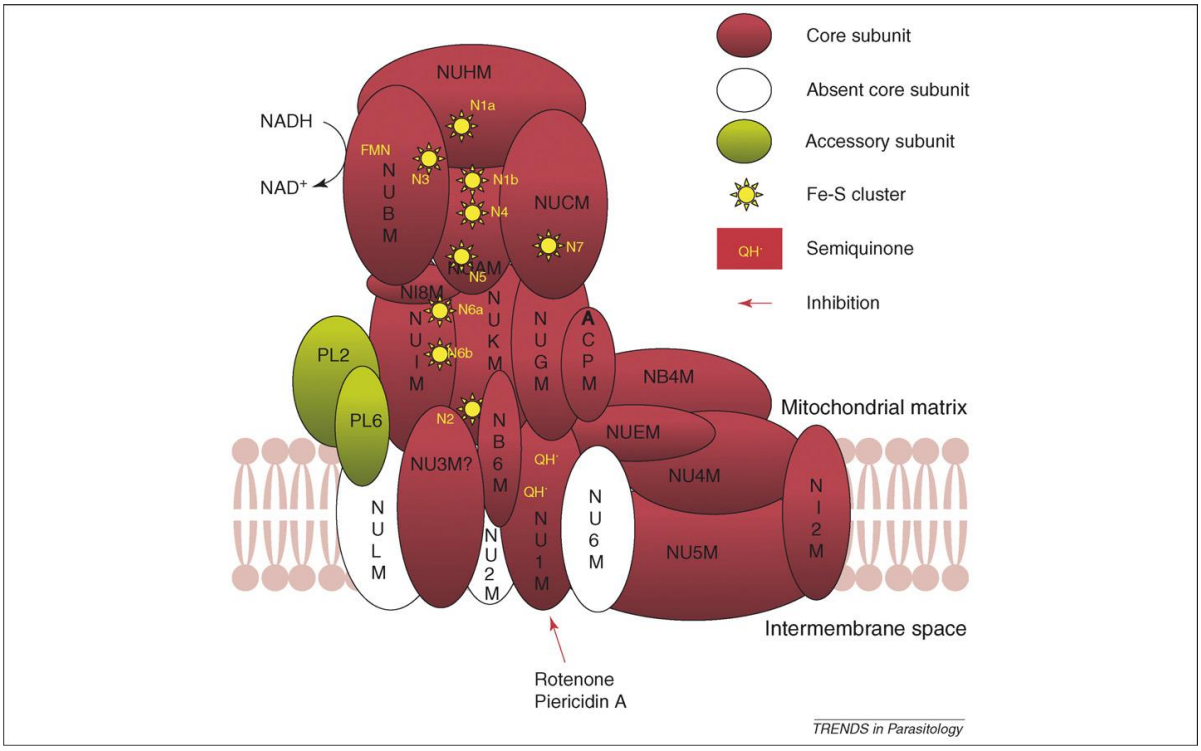
bioenergetických procesech odehrávající se v mitochondrii. RET má tak potenciál být účinným mechanismem pro redoxní signalizaci v buňce (Robb et al., 2018).



Obr. 2: Schéma komplexu I s vyznačenými místy produkce superoxidu na vazebném místě pro ubichinon a NADH (Murphy, 2009).

1.3 Komplex I u *Trypanosoma brucei*

Velikost komplexu I u *T. brucei* je asi 2,5 MDa a je tak výrazně větší než u ostatních eukaryot (Duarte & Tomás, 2014). Trypanosomy mají komplex I poskládán z minimálně 60 podjednotek. Podjednotky kódované v jaderné DNA mají konzervovanou strukturu a jejich homology u savců představují 4 podjednotky s NADH vazebným místem, FMN a FeS klastry. Funkce transportu elektronů je tedy u trypanosom zachována. V mitochondriální DNA, tzv. kinetoplastu (kDNA), je kódováno 8 podjednotek, které jsou součástí centrální, hydrofobní části komplexu I. Dále se u trypanosom, stejně jako u ostatních eukaryot, nachází velké množství doplňkových podjednotek. Velká část těchto doplňkových podjednotek je u trypanosom druhově specifická. Homologní doplňkové podjednotky se navíc odlišují svojí velikostí, protože bývají mnohem větší než podjednotky savců (Duarte & Tomás, 2014; Opperdoes & Michels, 2008). Příkladem doplňkové podjednotky, kterou nacházíme u všech eukaryot, je NDUFA6, jejíž delece v kvasinkách vedla k odtržení acyl carrier proteinu (ACP) podílejícího se na syntéze mastných kyselin a k narušení ubichinon reduktázové aktivity (Angerer et al., 2014). Nicméně funkce většiny specifických doplňkových podjednotek není známa. Některé z nich se nepodílejí na funkci komplexu I, fungují jako samostatné enzymy a komplex I využívají spíše jako lešení (Acestor et al., 2011). Příkladem takového enzymu je superoxid dismutáza, která detoxifikuje produkovaný superoxid (Duarte & Tomás, 2014). Některé podjednotky, které jsou pro eukaryota typické, naopak u trypanosom chybí. Například centrální hydrofobní membránové podjednotky NULM a NU6M kódované v eukaryotické mitochondriální DNA, které jsou zodpovědné za pumpování protonů, se u trypanosom nevyskytují. Komplex I u *T. brucei* tak zřejmě není schopen transdukce energie přenosem protonů (Opperdoes & Michels, 2008; Surve et al., 2012). Struktura komplexu I *T. brucei* s vyznačeným umístěním některých podjednotek je na obrázku 3.



Obr. 3: Schéma struktury komplexu I u T. brucei s pozičně umístěnými podjednotkami (Opperdoes & Michels, 2008).

O mechanismech, jakými dochází ke skládání komplexu I u trypanosom, není známo mnoho. U krevní formy bylo zjištěno, že dochází ke tvorbě subkomplexů a že pro jejich poskládání jsou esenciální proteiny, jež kódují mitochondriální geny (Surve et al., 2012). U trypanosom bylo také detekováno několik proteinů, jejichž ortology jsou definované u savců jako pomocné faktory pro skládání komplexu I. Skládání komplexu tak zřejmě probíhá mechanismy, jež jsou do jisté míry konzervované. Přesná funkce těchto faktorů většinou není známa, nicméně pravděpodobně zajišťují stabilizaci subkomplexů a umožňují jejich asociaci s dalšími faktory podílejícími se na sbalení komplexu (Duarte & Tomás, 2014).

V procyklické formě *T. brucei* se komplex I nachází, ale v bioenergetice mitochondrie zřejmě nehraje žádnou významnou roli. V těchto buňkách má komplex I pouze 20 % podíl na NADH:ubichinon dehydrogenázové aktivitě. Tato aktivita ale není pro buňky esenciální, protože při umlčení tří centrálních podjednotek podílejících se na přenosu elektronů (NUBM, NUEM, NUKM) pomocí RNA interference (RNAi) nebyla pozorována žádná změna růstového fenotypu (Verner et al., 2011). I když respirace přes NADH u procyklické formy je inhibována rotenonem (inhibitor komplexu I), dochází k tomu za výrazně vyšších koncentrací rotenonu (30 - 100µM), než je u jiných eukaryot běžné (Duarte & Tomás, 2014;

Hernandez & Turrens, 1998). Tento jev může být vysvětlen tím, že specifická struktura komplexu I u *T. brucei* má vliv na vazbu rotenonu a činí tak komplex I méně senzitivním (Duarte & Tomás, 2014). Navíc bylo zjištěno, že rotenon při vysokých koncentracích (10 - 100μM) může inhibovat i jiné elektronové přenašeče, jako například NADH fumarát reduktázu (Hernandez & Turrens, 1998). Bohužel tak experimenty s rotenonem nevedly k přímému důkazu, že se komplex I u *T. brucei* účastní buněčné respirace, jelikož inhibice respirace při vysokých koncentracích rotenonu může být způsobena nespecifickým působením tohoto inhibitoru na jiné elektronové přenašeče.

Hlavním enzymem k regeneraci NAD^+ je zřejmě alternativní dehydrogenáza typu II, NDH2. Jde o alternativní dehydrogenázu katalyzující přenos elektronů z NADH na ubichinon bez současného pumpování protonů přes membránu. Tento enzym byl popsán v rostlinách, houbách, bakteriích a protozoech, ale ne u živočichů (Kerscher, 2000). NDH2 je místem alternativního vstupu elektronů do respiračního řetězce a může oxidovat jak cytosolické tak mitochondriální NADH a NADPH v závislosti na umístění vazebného místa (Fang & Beattie, 2002). Nicméně lokalizace NDH2 ve vnitřní membráně mitochondrie je stále nejistá. V experimentech s *T. brucei* procyklického stádia byla pozorována NDH2 - spřažená oxidace cytosolického NADH, ale v pokusech s krevním stádiem byla dehydrogenázová aktivita prostřednictvím NDH2 detekována v matrix mitochondrie (Surve et al., 2016; Verner et al., 2013). Vysvětlením může být, že NDH2 se vyskytuje na obou stranách mitochondriální membrány (Duarte et al., 2021).

Ztráta NDH2 u procyklik̊ má vliv jak na růstový fenotyp, tak na membránový potenciál (Verner et al., 2013). Jelikož odstranění komplexu I nemá na růst buněk žádný vliv na rozdíl od efektu RNAi u NDH2, lze vyvozovat, že NDH2 má pro bioenergetiku *T. brucei* větší význam než komplex I (Verner et al., 2011, 2013). Dehydrogenázová aktivita v mitochondrii procyklik̊ je snížena o 80 % působením inhibitoru NDH2 – DPI (diphenyleneiodonium), kdežto rotenon, specifický inhibitor komplexu I, tuto aktivitu snižuje jen o 20 %. Tento experiment tedy naznačuje, že k oxidaci NADH dochází preferenčně dehydrogenázou NDH2 (Verner et al., 2011). Zásadní je také rozdíl ve významu komplexů elektronového řetězce pro vytváření protonového gradientu a návazně pro oxidativní fosforylaci. V médiu bez glukózy, kdy jsou buňky závislé na produkci energie oxidativní fosforylací, jsou komplexy II, III a IV esenciální a při jejich deleci je pozorován výrazný růstový fenotyp (Coustou et al., 2008; Horváth et al., 2005). Naproti tomu snížení abundance komplexu I nemá na růst buněk za těchto podmínek vliv, což naznačuje, že komplex I

nepřispívá svou proton-transportující funkcí k produkci ATP pomocí oxidativní fosforylace (Coustou et al., 2008).

V krevní formě byly detekovány stejné podjednotky komplexu I jako u procyklické formy, ale důvod skládání a přítomnosti tohoto komplexu nebyl ani u tohoto stádia objasněn (Surve et al., 2012). Geny podjednotek komplexu I kódované v mitochondrii jsou v krevní formě transkribovány a některé z nich jsou dokonce preferenčně editovány (Souza, Myler, & Stuart, 1992; Surve et al., 2012). V případě snížení exprese katalytických podjednotek (NUBM a NUKM) ale nedochází ke zhoršení růstového fenotypu buněk. Stejně tak na nativním gelu nebyla pozorována žádná dehydrogenázová aktivita odpovídající aktivitě komplexu I. Z toho vyplývá, že komplex I se na regeneraci NAD^+ z NADH u krevní formy nepodílí, avšak zdá se, že aktivita komplexu I může alespoň kompenzovat katalytickou aktivitu NDH2 v případě její ztráty (Surve et al., 2012, 2016).

Například u organismů *Plasmodium* a *Saccharomyces* se funkční komplex I také nevyskytuje, ale na rozdíl od *Trypanosoma brucei* tato ztráta koreluje s úplnou ztrátou klíčových genů komplexu I (Büschges, Bahrenberg, Zimmermann, & Wolf, 1994; Saleh, Friesen, Baumeister, Gross, & Bohne, 2007).

U genů komplexu I byly pozorovány vlastnosti naznačující důležitou funkci komplexu I během diferenciace *T. brucei*. V experimentech sledujících diferenciaci bylo pozorováno, že některé podjednotky specifické pro trypanosomy se exprimují jen během diferenciace (Alsford et al., 2011). Mutační rychlost těchto genů je stejná jako u esenciálních genů, přestože v procyklickém ani krevním stádiu komplex I významnou roli nemá (Surve et al., 2012). Můžeme se tedy domnívat, že aktivita komplexu I je potřebná v některém z jiných vývojových stádií *T. brucei*. Bývá naznačováno, že komplex I by mohl zajišťovat udržování membránového potenciálu, případně tvorbu ATP během diferenciace (Bienen, Saric, Pollakis, Grady, & Clarkson, 1991).

Krátká zavalitá forma vyskytující se v krevním řečišti savců se diferencuje z dlouhé krevní formy a účastní se přenosu mezi hostiteli, ze savce do mouchy. O metabolismu této krevní formy není známo mnoho. Generování membránového potenciálu zajišťuje F_1F_O ATP syntáza (komplex V) stejně jako u dlouhé štíhlé formy. Při deleci mitochondriální DNA stále dochází k diferenciaci z dlouhé na krátkou formu, ale u krátké zavalité formy dochází k neschopnosti vytvářet membránový potenciál na rozdíl od dlouhé štíhlé formy. Ztráta membránového potenciálu však není pro krátké zavalité stádium letální, přestože jejich délka

života je snížená a životaschopnost buněk tak ovlivňuje ztráta jiných genů kinetoplastu než genů F_1F_O ATP syntázy (Dewar et al., 2018). Navíc je známo, že diferenciace na krátké zavalité stádium je spojena se zvýšenou NADH dehydrogenázovou aktivitou (Vickerman, 1965). Možným kandidátem by tak mohl být komplex I, jehož několik podjednotek je kódováno v kinetoplastu a akinetoplastové buňky tak budou zřejmě postrádat komplex I (Dewar et al., 2018; Surve et al., 2012).

1.4 Metabolické adaptace v životním cyklu *Trypanosoma brucei*

T. brucei během svého životního cyklu prochází výraznými změnami týkajícími se metabolismu. Důvodem těchto změn je potřeba adaptace na výrazně odlišná prostředí, která mají různou teplotu a obsahují jiný typ živin, které může parazit využívat. Procyklická forma žijící v mouše tse-tse spotřebovává aminokyseliny jako prolin, které oxiduje na sukcinát, acetát, laktát a alanin a ATP produkuje oxidativní fosforylací (Mantilla et al., 2017). Respirace probíhá v elektronovém transportním řetězci, který slouží také k udržování membránového potenciálu (Acestor et al., 2011). Samotná mitochondrie u procyklického stádia má spoustu krist a je roztažená přes celou buňku (Vickerman, 1985). Krevní stádium *T. brucei* v savcích má naopak k dispozici spoustu glukózy, kterou zpracovává glykolýzou. Komplexy III a IV vytvářející membránový potenciál nejsou v mitochondrii přítomny. Membránový potenciál je udržován komplexem V při hydrolýze ATP a respirace probíhá na enzymu alternativní oxidáze (trypanosome alternative oxidase, TAO), která přijímá elektrony z ubichinonu a redukuje kyslík za vzniku vody (Chaudhuri, Ott, & Hill, 2006). Struktura mitochondrie je v tomto stádiu tubulární, táhnoucí se od anterierního k posteriernímu konci, a bez patrných krist (Doleželová et al., 2020; Smith et al., 2017).

V laboratorních podmínkách může být diferenciace *T. brucei* indukována *in-vitro* zvýšením exprese proteinu vázajícího RNA - RBP6 proteinu. *In-vitro* exprese RBP6 indukuje diferenciaci z procyklických buněk na epimastigoty a dále na infekční metacykliky (Kolev, Ramey-Butler, Cross, Ullu, & Tschudi, 2012). Během této diferenciace bylo pozorováno několik zajímavých znaků. Postupně se snižovaly hladiny komplexů III a IV, zatímco množství komplexu I bylo mírně zvýšené. Množství komplexu II bylo zvýšené stejně jako další enzymy Krebsova cyklu a transportéry prolinu, což naznačuje, že spotřeba prolinu během diferenciace narůstá. Dalším znakem je nárůst membránového potenciálu, i když respirace probíhá přednostně přes alternativní oxidázu. Kromě toho se zvýšila produkce ROS v mitochondrii a za přítomnosti katalázy, enzymu rozkládajícímu peroxid vodíku, došlo k zastavení diferenciace (Doleželová et al., 2020). Je třeba dodat, že například u organismu

Leischmania, který rovněž patří mezi trypanosomy, bylo již prokázáno, že ROS mohou indukovat diferenciaci (Mittra et al., 2013).

Předpokládaným místem produkce ROS během diferenciace by mohl být komplex I. Jedním z podpůrných argumentů je, že během diferenciace je přenos elektronů zajišťován alternativní cestou, kdy je vynechán komplex III, který navíc v průběhu diferenciace mizí. Během diferenciace byly také pozorovány znaky podporující přenos elektronů reverzní cestou (RET), jmenovitě zvýšená oxidace sukcinátu a vyšší membránový potenciál (Doleželová et al., 2020). Pozorované skutečnosti jako stabilita komplexu I, zvýšený membránový potenciál a produkce ROS spolu s nejasnou funkcí komplexu I a možností role ROS v buněčné signalizaci nás vedou k hypotéze, že komplex I zastává důležitou roli právě během diferenciace hmyzích forem *T. brucei.* O samotném průběhu diferenciace hmyzích stádií není známo mnoho, protože *in-vitro* systém umožňující takové studie byl vyvinut relativně nedávno.

2. Cíle práce

- Vytvořit linii *Trypanosoma brucei* pro knock-out podjednotky NDUFA6
- Vytvořit linii *Trypanosoma brucei* pro knock-out podjednotky NUBM
- Ověřit vliv ztráty podjednotek NDUFA6 anebo NUBM na růstový fenotyp pro procyklické buňky *T. brucei*
- Zjistit vliv eliminace NDUFA6 anebo NUBM na NADH dehydrogenázovou aktivitu v nativním gelu
- Ověřit citlivost linií se sníženou expresí komplexu I na rotenon

3. Metody

3.1 Linie *Trypanosoma brucei*

V této práci bylo používáno několik linií procyklického stádia *T. brucei*. Linie Lister 427 je divokým typem. Linie 29-13 je linie exprimující tetracyklinový represor a T7 RNA polymerázu pod selekčními markery neomycinem a hygromycinem (Wirtz, Leal, Ochatt, & Cross, 1999). Linie 29-13 tedy obsahuje expresní systém sloužící k podmíněné indukci jakéhokoliv genu a je dále parentální linií pro námi používané linie 29-13_NUBM^{V5tag} a RBP6$^{O/E}$. Linie 29-13_NUBM^{V5tag} byla vytvořena studentkou v naší laboratoři a má k jedné alele genu NUBM připojenou V5 značku se selekčním markerem puromycinem (díky patří Michaele Kunzové). RBP6$^{O/E}$ obsahuje kazetu pro zvýšenou RBP6 expresi pod antibiotikem phleomycinem a exprese proteinu RBP6 je indukována přidáním tetracyklinu (1-10µg/ml), čímž je indukována diferenciace (Kolev et al., 2012). Buňky byly chovány v inkubátoru při 27 °C. Byla použita média SDM-79 s 10 % FBS obsahující glukózu a SDM-80 s 10 % FBS a 50mM N-acetyl-glukosaminem bez glukózy. Koncentrace používaných antibiotik v médiu jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Koncentrace selekčních antibiotik používaných u Trypanosoma brucei.

antibiotikum	**koncentrace**
G418 (neomycin)	15µg/ml
hygromycin	25µg/ml
phleomycin	10µg/ml
puromycin	10µg/ml

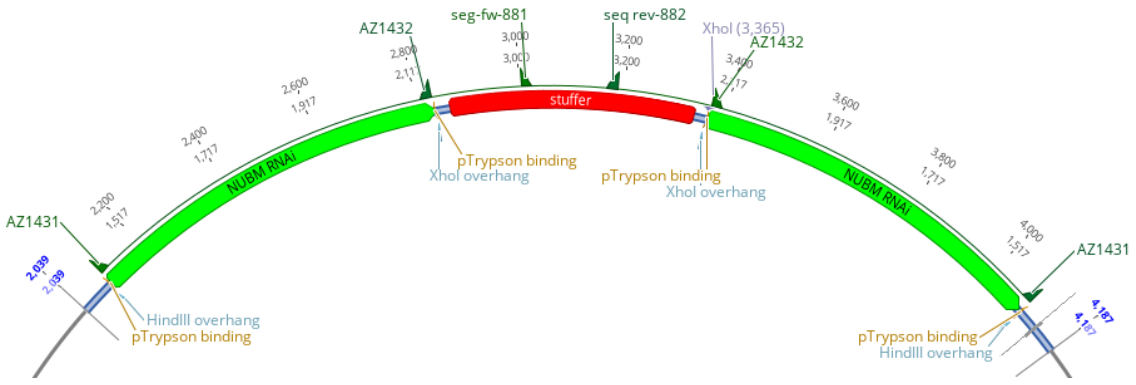
3.2 Vytvoření geneticky modifikovaných linií *Trypanosoma brucei*

Ke snížení exprese byly vybrány dvě podjednotky komplexu I – NDUFA6 a NUBM. Funkce podjednotky NDUFA6, známé také jako podjednotka 14, nebyla u *T. brucei* identifikována. U kvasinek byla prokázána esenciální role této podjednotky pro aktivitu komplexu I (Angerer et al., 2014). V naší laboratoři máme k dispozici specifickou protilátku proti NDUFA6. Podjednotka NUBM je konzervovaná a přímo se podílí na katalytické aktivitě komplexu I. Sekvence genů NDUFA6 (Tb927.10.14860) a NUBM (Tb927.5.450) byly získány z databáze tritrypdb.org.

3.2.1 Příprava vektorů umožňující expresi vlásenkové dvouvláknové RNA cílené na NDUFA6 a NUBM podjednotky

RNA interference (RNAi) je používána ke snížení exprese specifického genu na úrovni mRNA. Dvouvláknová interferující siRNA je homologní s cílovou mRNA, se kterou interaguje, čímž způsobí její degradaci (Fire et al., 1998).

Dvouvláknová RNA použitá k RNAi byla generována použitím vektoru pTrypson, ve kterém se nacházely dva fragmenty cílové sekvence v invertované orientaci oddělené tzv. stufferem (McAllaster, Sinclair-Davis, Hilton, & de Graffenried, 2016) (Obr. 4). Transkripcí takového vektoru vzniká vlásenková struktura dvouvláknové RNA. K použití RNAi byl vytvořen vektor nesoucí část kódující sekvence genu podjednotky NDUFA6 (553 bp), resp. NUBM (723 bp). Specifická sekvence, na kterou byla RNAi cílena, se v obou případech nacházela v kódující části genu. K vytvoření vektoru byl použit plasmid pTrypson obsahující restrikční místa HindIII a XhoI. K ligaci cílových sekvencí a vektoru byla použita metoda Gibson assembly sloužící k ligaci několika DNA fragmentů pomocí dlouhých homologních přesahů (Gibson et al., 2009).



Obr. 4: Schéma vektoru pTrypson použitého k RNAi, jsou vyznačena používaná restrikční místa HindIII a XhoI.

Plasmid pTrypson byl štěpen zvlášť enzymem HindIII a XhoI. Štěpení enzymem HindIII oddělilo kostru vektoru (5632 bp), enzymem XhoI byla oddělena sekvence stufferu (533bp), který je ve vektoru vložen mezi dvě sekvence cílového genu (Obr. 4). Fragmenty byly rozděleny DNA elektroforézou v 1 % gelu, z gelu vyříznuty a izolovány komerčně dostupným kitem (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich®).

NUBM a NDUFA6 specifické fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR s využitím KOD Hot Start DNA polymerázy (Sigma-Aldrich), templátem byla genomová DNA linie divokého typu Lister 427. Použité primery obsahovaly 31bp přesahy homologní s vektorem pTrypson a cca 20bp přesahy homologní se sekvencí genu (Tab. II), průběh reakce je zaznamenán v Tab. III, složení reakce je v Tab. IV.

Plasmid byl poskládán použitím Gibson Assembly® kitu (Gibson Assembly®, New England BioLabs® Inc.). Ligační reakce obsahovala celkem 1pmol DNA v poměru 3:1 fragmenty ku vektoru, kdy vektor tvořil 0,25pmol, stuffer 0,3pmol a specifický fragment 0,45pmol. Celkový objem reakce byl 20µl a obsahoval 10µl (2x) Gibson Assembly Master Mix. Ligační reakce byla inkubována v termocycleru při 50 °C po dobu 1 hodiny.

Ligační reakce v objemu 10µl byla zatransformována do NEB 5-alfa kompetentních *E. coli* buněk, které byly součástí kitu. Bakterie s DNA byly inkubovány 30 min na ledu a na 30 s vystaveny heat-shocku při 42 °C, následně byla provedena inkubace 2 min na ledu. Pak bylo přidáno 950µl S.O.C. média (0,5 % kvasinkový extrakt, 2 % trypton, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10mM $MgCl_2 \times 6H_2O$, 20mM glukóza) a směs byla přenesena na třepačku při 37 °C na 1 hod. Buňky v objemu 200µl byly rozprostřeny na agarovou misku se selekčním antibiotikem ampicilinem (100µg/ml) a inkubovány v 37 °C přes noc. Bílé kolonie na misce byly selektovány a namnoženy v LB médiu (1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl) přes noc v 37 °C. Modifikovaný plasmid pTrypson byl izolován z buněk s použitím komerčního kitu (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich®). Pro ověření vektoru byl plazmid naštípán restrikčními enzymy HindIII a XhoI (15 min, 37 °C) a separován pomocí DNA elektroforézy v 1 % agarozovém gelu. Plasmidy se správnou velikostí fragmentů po restrikci byly poslány na sekvenaci (Seqme s.r.o.). Ověřený plasmid byl linearizován štěpením restrikčním enzymem Not I (37 °C, 2,5 hod) a transfekován do buněk 29-13 a $RBP6^{O/E}$ tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.6.

Tab.II: Primery použité na amplifikaci fragmentů použitých v Gibson assembly. Červeně jsou vyznačeny úseky homologní k cílovým sekvencím genů.

název primeru	**kód primeru**	**restrikční místo**	**sekvence**
Gibson NDUFA6 fw	AZ1108	XhoI	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCGAGCGTTGTTCCTCTCCGTTCCAGAAG
Gibson NDUFA6 rev	AZ1109	HindIII	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGCTTGCAAGTTTGAGCAAGCACCATAC
Gibson NUBM fw	AZ1431	HindIII	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGCTTGTGTCCCACCACTGTGACAA
Gibson NUBM rev	AZ1432	XhoI	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCGAGGCGTAGTAGCGATGCGTCTT

Tab. III: Průběh PCR reakce při amplifikaci fragmentů použitých na Gibson assembly. Teplota nasedání primerů 62 °C byla použita v případě genu NDUFA6, 59,3 °C pro gen NUBM.

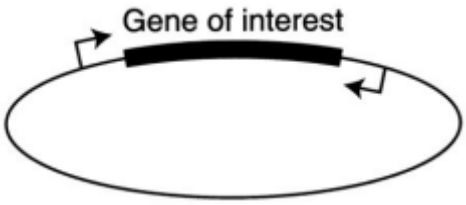
počet cyklů	**teplota (°C)**	**čas**
1	95	2 min
40	95	20 s
	59,3/62	10 s
	70	12 s

Tab. IV: Složení PCR reakce s použitím KOD Hot Start polymerázy ve finálním množství 50µl

roztok	**finální koncentrace**
10× pufr	1×
$MgSO_4$ (25mM)	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
primer forward (10mM)	0,3 µM
primer reverse (10mM)	0,3 µM
polymeráza	0,02 U/µl
DNA	100ng

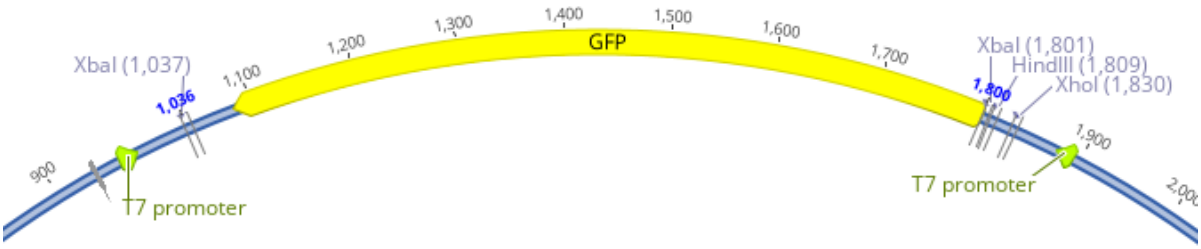
3.2.2 Příprava vektorů umožňující expresi dvouvláknové RNA pomocí head-to-head promotorů cílené na NUBM podjednotku

Další metoda pro expresi dsRNA využívá dvou bakteriofágních promotorů T7 RNA polymerázy ve vektoru, kdy jeden z promotorů je v invertované pozici. Část cílové sekvence je do vektoru vložena mezi T7 promotory, čímž je umožněna transkripce obou vláken vložené DNA současně a vzniká dvouvláknová mRNA (Obr. 5) (LaCount, Bruse, Hill, & Donelson, 2000).



Obr. 5: Schéma plasmidu využívajícího head-to-head promotory (LaCount et al., 2000).

Byl použit plasmid p2T7-177 obsahující sekvenci pro GFP protein mezi T7 promotory (Obr.6) (Wickstead, Ersfeld, & Gull, 2002). GFP gen byl vyštěpen restrikcí XbaI enzymem (1,5 hod., 37 °C). Fragment plasmidu byl ověřen DNA elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu. Následně byla provedena opětovná cirkularizace plasmidové DNA spojením konců (4 °C, přes noc) v ligační reakci obsahující 1µl 10x ligačního pufru, 1µl T4 DNA polymerázy. Reakce měla finální objem 10µl. Cirkulární vektor p2T7-177 bez GFP byl štěpen XhoI a HindIII restrikčními enzymy, po ověření velikosti vektoru na 0,8 % gelu byl extrahován z gelu pomocí kitu. Jako cílová sekvence genu NUBM pro RNAi byl použit fragment, který byl amplifikován pomocí primerů AZ1431, AZ1432 v PCR reakci popsané v kapitole 3.2.1 z templátové genomové DNA linie Lister 427 (Tab. II, III, IV). Fragment byl štěpen XhoI a HindIII restrikčními enzymy, ověřen na 1 % agarózovém gelu a purifikován z gelu pomocí kitu. Poté byl fragment (730 bp) zaligován do vektoru v ligační reakci se stejným složením jako při cirkularizaci. Dále byl plasmid transformován do *E. coli* XL1-blue kompetentních buněk s rezistencí na ampicilin.



Obr. 6: Schéma plasmidu p2T7-177 s GFP. V obrázku jsou vyznačena restrikční místa XbaI, HindIII a XhoI použitá při klonování.

Kompetentní buňky v objemu 60µl byly smíchány s 6µl ligační směsí a 15 min chlazeny na ledu. Následoval 50sekundový heat-shock ve vodní lázni při 42 °C a zchlazení na 2 minuty. Poté byly buňky smíchány s 300µl S.O.C. média a 1 hodinu třepány při 37 °C. V posledním kroku byly buňky naneseny na misku s agarem a selekčním antibiotikem (ampicilin, 100µg/ml). Buňky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C přes noc.

Kolonie na misce byly selektovány a namnoženy v LB médiu přes noc v 37 °C. Plasmidy byly purifikovány pomocí komerčně dostupného kitu (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich®) a ověřeny restrikčními enzymy XhoI a HindIII (15 min, 37 °C). Fragmenty byly separovány v 1 % gelu a plasmidy s odpovídající velikostí fragmentů byly sekvenovány (Seqme, s.r.o.). Ověřený plasmid byl linearizován štěpením restrikčním enzymem Not I (37 °C, 2,5 hod) a transfekován do buněk 29-13_NUBM^{V5tag} tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.6.

3.2.3 Ověření RNAi linií pomocí western blotu

Účinnost RNAi byla ověřována pomocí western blotu, kdy byla použita specifická protilátka proti cílovým proteinům. Byly použity proteiny z lyzátů z celých buněk. Buňky v množství 1×10^7-5×10^7 byly 10 minut točeny při 1300×g při pokojové teplotě, resuspendovány v 1 ml PBS (1,5M NaCl, $NaH_2PO_4\times2H_2O$, 100mM $Na_2HPO_4\times12H_2O$) a následně znovu stočeny. Buněčné lyzáty byly smíchány s roztokem PBS a SDS nanášecím barvivem (150 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 % SDS, 30 % glycerol, 300 mM DTT, 0,02 % bromfenolová modř) v poměru 3:1 tak, aby 30 µl lyzátu tvořilo 1×10^7 buněk. Směs byla inkubována 7 minut při 97 °C. Na gel bylo naneseno 20 µl směsi proteinů. Elektroforetická separace probíhala nejdříve 20 minut při 90 V a následně 1 hodinu na 120 V v SDS pufru (250mM Tris, 1,92M glycin, 1 % SDS). Proteiny byly poté přeneseny na PVDF membránu

během transferu v pufru (48mM Tris, 39mM glycin, 20 % metanol), který probíhal 100 minut při 100 V. Membrána byla vyblokována v 5 % roztoku mléka a PBS-T (0,15M NaCl, 10mM $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, 10mM $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$, 0,05 % Tween®20 detergent) po 1 hodinu. Membrána byla nejprve inkubována s primární protilátkou (Tab. V) a následně se sekundární protilátkou (1:2000), obě inkubace trvaly 1 hodinu a mezi inkubacemi byla membrána promývána v roztoku PBS-T po dobu 30 min. Nakonec byla membrána promyta v PBS-T a specifické proteiny na membráně detekovány pomocí chemiluminiscence. K detekci byla použita křenová peroxidáza (BioRad, Clarity Western ECL substrate).

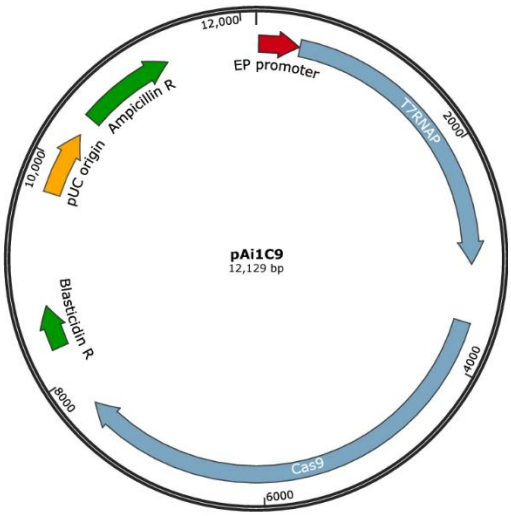
Tab. V: Seznam protilátek použitých při ověřování linií s RNAi.

značený protein	**původ protilátky**	**ředění**	**velikost proteinu (kDa)**
NDUFA6	polyklonální	1:500	84
NUBM V5tag	monoklonální	1:2000	60
APRT	polyklonální	1:100	26
tetracyklinový represor	monoklonální	1:1000	22
T7 RNA polymeráza	polyklonální	1:1000	99

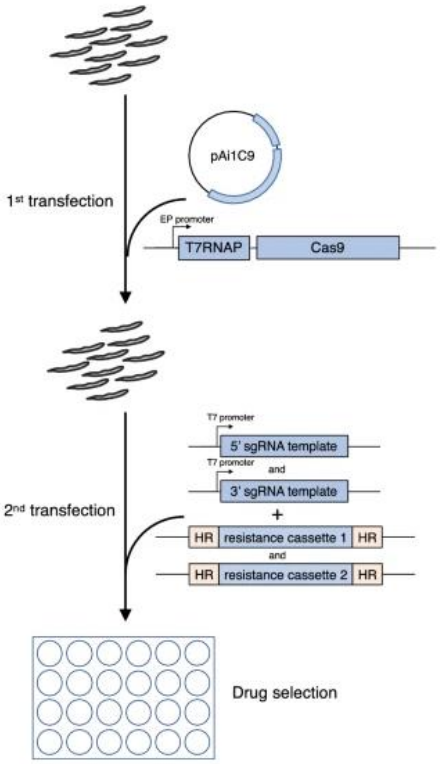
3.2.4 Vytvoření knock-outu pro NDUFA6 pomocí transientní CRISPR/Cas9 metody

Metoda CRISPR/Cas9 je založena na přirozené schopnosti bakterií bránit se proti infekci virem. Po vstupu a detekci DNA viru v buňce je vytvořena krátká molekula RNA, nazývaná guide RNA, která je komplementární k virové DNA. Guide RNA tvoří komplex s enzymem nukleázou Cas9 a navádí Cas9 k cílové DNA. Cas9 následně způsobí dvouvláknový zlom DNA, a tedy degradaci cílové DNA (Doudna & Charpentier, 2014). V experimentální biologii organismu *T. brucei* je tato metoda využívána k editaci genomu, kdy zlom způsobený Cas9 je nespecificky opraven spojením konců DNA (microhomology - mediated end joing, MMEJ), což zapříčiní malé delece v cílené sekvenci, anebo, při dodání DNA templátu, jsou vneseny precizní specifické genové modifikace (Beneke et al., 2017).

Transientní CRISPR/Cas9 metoda u *T. brucei* umožňuje vytvoření linií přechodně exprimujících T7 RNA polymerázu a Cas9 nukleázu po první transfekci. Využívá plasmid pAi1C9 obsahující geny jak pro Cas9, tak pro T7RNAP (Obr. 7). Během 24 hodin po první transfekci je provedena druhá transfekce, která slouží k vnesení DNA templátů ve formě PCR fragmentů do buňky. První PCR templát je v buňce použit pro *in vivo* transkripci guide RNA a druhý PCR templát, který obsahuje kazetu se sekvencí selekčního markeru, je do genomu zabudována díky homologním přesahům při opravě dvouvláknových zlomů (Obr. 8) (Shaw et al., 2020).

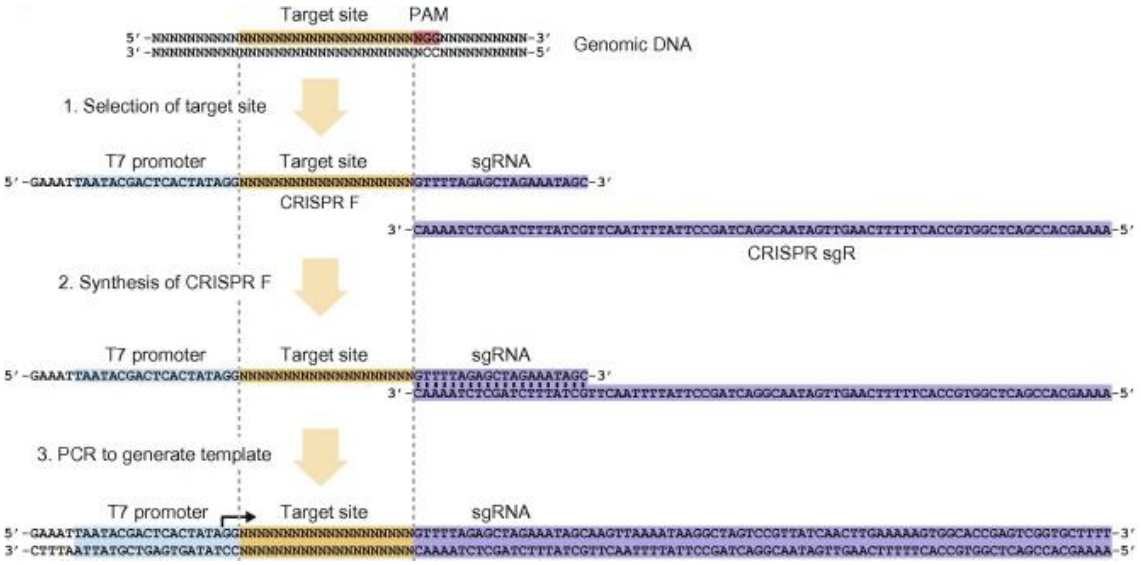


Obr. 7: Schéma plasmidu pAi1C9 (Shaw et al., 2020).



Obr. 8: Schéma transfekcí u transientní CRISPR/Cas9 metody u T. brucei (Shaw et al., 2020).

Pomocí PCR reakcí byly vytvořeny DNA templáty pro *in vivo* transkripci guide RNA (sgRNA). V každé reakci byl použit specifický forward primer obsahující na 5‘ konci T7 promotor, 18bp úsek určující cílové místo a na 3‘ konci úsek komplementární ke druhému primeru (G00 primer) obsahujícímu PAM-Cas9 sekvenci. G00 primer je univerzálním primerem a „kostrou“ sgRNA a v PCR reakci slouží jako reverse primer. Sekvence G00 primeru obsahující PAM-Cas9 místo je potřeba pro štěpení DNA Cas9 endonukleázou. Schéma syntézy sgRNA je na obrázku 9. Při reakci byly tedy použity primery v kombinaci NDUFA6-5sgRNA (AZ1204), resp. NDUFA6-3sgRNA (AZ1205) spolu s G00 primerem (AZ1208) (tzv. univerzální guide RNA scaffold). Sekvence pro guide RNA byla v 5‘ UTR, resp. 3’UTR oblasti, cílem tak byla celá kódující sekvence genu. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. VI, k navržení specifických primerů byl použit nástroj LeishGEdit (leishgedit.net, Beneke et al., 2017). Objem PCR reakce byl 40µl, složení a parametry reakce byly stejné jako je uvedeno v Tab. III a Tab. IV vyjma teploty nasedání primerů, která byla 51,1 °C.



Obr. 9: Schéma syntézy sgRNA během PCR reakce; CRISPR F – specifický forward primer, CRISPR sgR – G00 primer (Bassett & Liu, 2014).

S využitím PCR reakce byla také namnožena DNA kazeta se selekčním markerem puromycinem podle templátu pPOTv4 za použití primerů AZ1206 a AZ1243, jejichž součástí byla komplementární sekvence ke genu NDUFA6 (Tab. VI). Byla použita KOD Hot Start DNA polymeráza (Sigma-Aldrich) v reakci o objemu 40µl, průběh reakce je zaznamenán v Tab. VII a složení reakce bylo stejné jako v Tab. IV. Primery obsahovaly homologní úsek ke genu NDUFA6 (19bp) a při PCR reakci tak vznikl produkt, který je při CRISPR/Cas9 využíván jako templát pro reparaci dvouvláknových zlomů a specifickou modifikaci genu NDUFA6.

Plasmid pAi1C9 byl transfekován do buněk linie RBP6$^{O/E}$ tak jak je uvedeno v kapitole 3.2.6. Klony byly selektovány působením blasticidinu (10µg/ml). Následně byla do získaných klonů vložena puromycinová selekční kazeta a DNA templáty 5‘ sgRNA a 3‘ sgRNA. Klony byly selektovány pomocí puromycinu (1µg/ml).

Úspěšnost inkorporace selekční kazety do genomu metodou CRISPR/Cas9 a tedy úspěšnost knock-outu cílového genu NDUFA6 byla testována pomocí několika PCR reakcí. Kombinace primerů a jejich sekvence, velikost očekávaných produktů a specifika reakce jsou uvedeny v tabulkách (Tab. VIII, Tab. IX). Místa nasedání primerů a amplifikované oblasti genomu jsou znázorněny v obrázku 10.

Tab.VI: Primery použité při CRISPR/Cas9. Červeně jsou vyznačeny úseky homologní k NDUFA6 sekvenci.

název primeru	**kód primeru**	**sekvence**
NDUFA6-5sgRNA	AZ1204	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGGGGATTTTGTTTTGTCTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
NDUFA6-3sgRNA	AZ1205	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCCGTACATACTACAAAACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
NDUFA6-pPOTv4Puro-fw	AZ1206	CTTATCATACCCCTCGGTGACTCGATATTGGAGAAAGCAATAAAGCATC
NDUFA6-pPOTv4Puro-rev	AZ1243	ATCGCCTTTCTTCCCTATATTTGCGCCCTCATTTAGGTGACACTATAGA
G00	AZ1208	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

Tab. VII: Průběh reakce k amplifikaci puromycinové kazety z templátu pPOTv4.

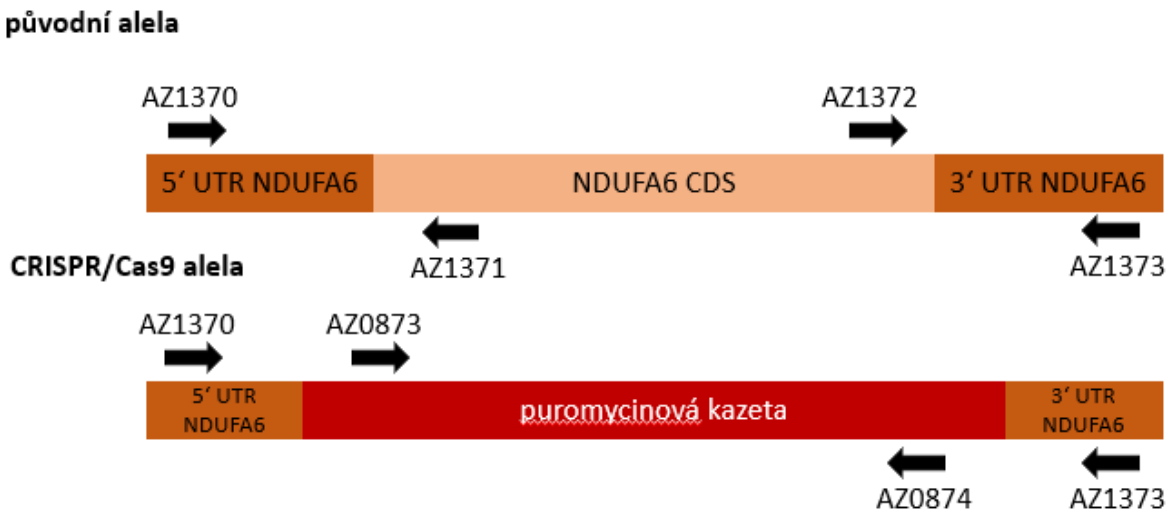
počet cyklů	**teplota (°C)**	**čas**
1	95	2 min
40	95	20 s
	50	10 s
	70	20 s
1	70	10 min

Tab. VIII: Specifika PCR reakcí pro testování úspěšnosti metody CRISPR/Cas 9 u genu NDUFA6.

název primerů	velikost PCR produktu	teplota nasedání	čas prodlužování
AZ0873 AZ0874	587 bp	64 °C	30 s
AZ1370 AZ1371	450 bp	58 °C	30 s
AZ1372 AZ1373	419 bp	58 °C	25 s
AZ1370 AZ1373	1307 bp	58 °C	1 min 20 s
AZ1370 AZ0874	900 bp	60 °C	1 min
AZ0873 AZ1373	995 bp	61 °C	1 min
AZ1370 AZ1373	2550 bp	58 °C	2 min

Tab. IX: Sekvence primerů použitých na ověření CRISPR/Cas9 linie.

název primerů	sekvence
AZ0873	GTTACCGAGTACAAGCCCACGG
AZ0874	TTGCGGGTCATGCACCAGGT
AZ1370	GGTGAGCTGCGGTTTCAG
AZ1371	CTCGCCTTCTTTTCGGGG
AZ1372	GGGCTGTTGTGGAGAGTAG
AZ1373	CACCGCTGCTAAGTGAATC



Obr. 10: Schéma původní NDUFA6 alely a alely po CRISPR/Cas 9 modifikaci s vloženou puromycinovou kazetou. Jsou vyznačena místa nasedání primerů v 5‘ a 3‘ místech integrace modifikované alely, přímo na modifikovanou alelu a na původní NDUFA6 alelu.

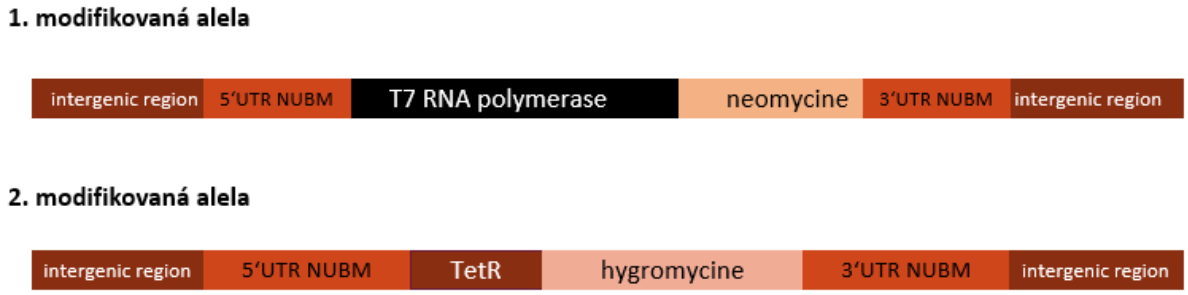
3.2.5 Knock-out obou alel genu NUBM pomocí homologní rekombinace

Double knock-out (dKO) je metoda umožňující deleci obou alel specifického genu a jejich nahrazení kazetou se selekčním markerem. Metoda využívá opravy DNA pomocí homologní rekombinace, kdy je na základě homologie vložena do genomu selekční kazeta namísto původní alely. Nejdříve je vyřazena první alela, která je nahrazena T7 polymerázou a selekčním markerem (v našem případě neomycinem) a po získání stabilních linií je druhá alela nahrazena tetracyklinovým represorem a dalším resistenčním markerem (hygromycin).

Fragmenty 5‘ UTR a 3‘ UTR oblastí NUBM byly amplifikovány pomocí PCR z genomové DNA linie Lister 427, genomová DNA byla z buněk izolována pomocí komerčně dostupného kitu. (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich®). Byla použita polymeráza OneTaq (New England BioLabs, Inc.). Postup a složení reakcí jsou uvedeny v tabulkách (Tab. X, Tab. XI). Pro knock-out druhé alely byly vybrány homologní úseky v UTR oblastech blíže ke kódující sekvenci, aby nedošlo k rekombinaci s první modifikovanou alelou (Obr. 11). Použité primery obsahující příslušná restrikční místa jsou uvedeny v tabulce (Tab. XII). 5‘ UTR PCR produkt byl naštípán restrikčními enzymy NotI a MluI, 3‘ UTR produkt byl naštípán XbaI, StuI enzymy. Fragmenty byly ověřeny na agarózovém 1,2 % gelu a z gelu izolovány pomocí komerčního kitu. Do plasmidu pLew13 obsahujícího příslušná restrikční místa byl zaligován 5‘ UTR úsek, úspěšnost klonování byla ověřena, a poté byla zaklonována 3‘ UTR část. Klonováním vznikl vektor obsahující geny pro T7 RNA polymerázu a neomycinovou resistenci ohraničené homologními 5‘UTR a 3‘UTR oblastmi NUBM. Modifikovaný plasmid pLew13 byl linearizován štěpením pomocí NotI enzymu (37 °C, 2,5 hod) a transfekován do buněk Lister 427 tak, jak je popsáno v kapitole 3.2.6. Po získání stabilních klonů byla z buněk izolována genomová DNA užitím komerčního kitu. U klonů byla otestována přítomnost modifikované kazety pomocí PCR a primerů uvedených v Tab. XIII, místa nasedání primerů jsou vyznačena na obrázku (Obr. 12).

Pro vyřazení druhé alely byl vytvořen pLew13 vektor obsahující 5‘ a 3’ UTR úseky NUBM homologní k UTR regionům v oblastech blíže ke kódující sekvenci, než tomu bylo u první alely. Vektor byl vytvořen stejným způsobem jako je uvedeno výše. Následně byl štěpen pLew90 enzymy XhoI a StuI, čímž byla vystřižena oblast hygromycinové resistence a tetracyklinového represoru. Tato kazeta byla následně vložena mezi 5‘ a 3‘ UTR oblasti v modifikovaném pLew13 vektoru. pLew13 byl linearizován při 37 °C, 2,5 hod enzymem NotI

a poté transfekován do buněk s již modifikovanou alelou. Transfekce probíhala stejně, jako je popsáno v kapitole 3.2.6.



Obr. 11: Schéma modifikovaných alel double knock-out strategie.

Tab. X: Složení PCR reakce pro fragmenty UTR oblastí NUBM sloužící k homologní rekombinaci, celkový objem reakce byl 50 µl.

roztok	**finální koncentrace**
5× OneTaq standard reaction pufr	1×
dNTPs (10 mM)	200 µM
primer forward (10 µM)	0,2 µM
primer reverse (10 µM)	0,2 µM
OneTaq DNA polymeráza	1,25 U/50 µl
DNA	500 ng

Tab. XI: Průběh PCR pro fragmenty UTR oblastí NUBM sloužící k homologní rekombinaci, s využitím OneTaq polymerázy.

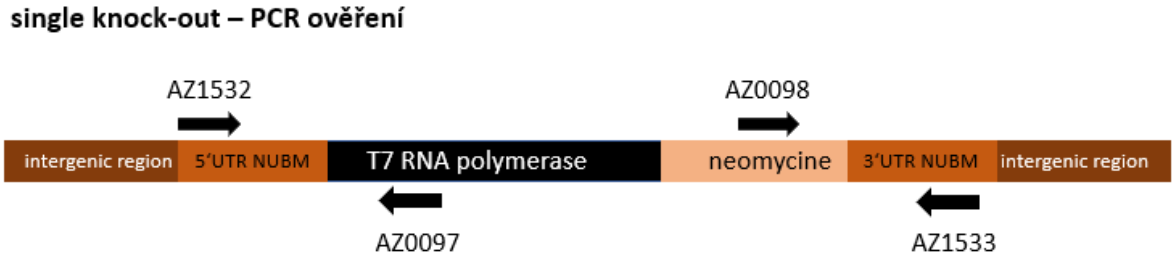
počet cyklů	**teplota (°C)**	**čas**
1	94	30 s
30	94	20 s
	61	30 s
	68	20 s
1	68	5 min

Tab. XII: Primery použité při amplifikaci homologních oblastí dKO NUBM. Podtržené jsou sekvence restrikčních míst.

název primeru	kód primeru	restrikční místo	sekvence
5' UTR sKO fw	AZ1451	NotI	ATAGCGGCCGCGGTTTACATTAGGTGCGTGCG
5' UTR sKO rev	AZ1452	MluI	ATAACGCGTCTCGAGTCTCCTTCTCCTTTCTCGCC
3' UTR sKO fw	AZ1453	XbaI	ATATCTAGAATTTAAATCATCAAGTTGACGGCGTTTC
3' UTR sKO rev	AZ1454	StuI, NotI	ATAAGGCCTGCGGCCGCAGACATGATCCCACCCCAC
5' UTR dKO fw	AZ1521	NotI	ATAGCGGCCGCTACAGTCAGTAGTCGCAGCG
5' UTR dKO rev	AZ1522	MluI	ATAACGCGTCTCGAGCACAAACGCACACAACCAC
3' UTR dKO fw	AZ1523	XbaI	ATATCTAGAATTTAAATGAAAATATCGTATGGGCGCC
3' UTR dKO rev	AZ1524	StuI, NotI	ATAAGGCCTGCGGCCGCAAGGTGCGACTCAGTTAAAC

Tab. XIII: Sekvence primerů určených k verifikaci double knock-outu genu NUBM.

název primerů	sekvence
AZ0098	CTTGCCGAATATCATGGTGG
AZ0097	GTAAATCCGGATCAGATCAGC
AZ1532	TGTTTGCCTGCATGGTGTATG
AZ1533	AACCCAACAAAAACGGCAGC



Obr. 12: Schéma oblastí testovaných pomocí PCR k ověření knock-outu jedné alely NUBM.

3.2.6 Transfekce vytvořených vektorů do linií *Trypanosoma brucei*

Buňky *T. brucei* o koncentraci $1x10^7$ /ml byly stočeny po dobu 10 min při 1300 × g při 4 °C. Pelet buněk byl resuspendován v 5 ml studeného roztoku CytoMix (25mM hepes (pH 7,6), 120mM KCl, 0,15mM $CaCl_2$, 50mM KH_2PO_4 ,50mM K_2HPO_4, 2mM EDTA, 5mM $MgCl_2$, 6mM glukóza) a znova stočeny. Nakonec byly buňky resuspendovány v 0,5 ml CytoMixu (pH 7,6). Kyveta byla naplněna chlazenou sterilní linearizovanou DNA o objemu 10µl a do kyvety bylo přidáno 0,5 ml směsi buněk. Buňky byly elektroporovány a poté smíchány s 6 ml SDM-79 média s příměsí 10 % FBS. Buňky byly inkubovány přes noc v 27 °C. Poté bylo přidáno 6 ml média s 2 × koncentrací selekčního antibiotika. Konečná koncentrace antibiotika byla 2,5µg/ml pro phleomycin, 10µg/ml pro blasticidin. Buňky po transfekci byly rozředěny do 24 jamkové destičky k získání semi-klonálních linií. Selekce probíhala cca 3 týdny.

3.3 Růstové křivky

U geneticky modifikovaných linií nás zajímal vliv absence podjednotek komplexu I na schopnost buněk dělit se. Byla indukována RNAi pomocí tetracyklinu po dobu 6-8 dní a každý den byla měřena koncentrace buněk v 10ml média. Počáteční koncentrace buněk byla 2×10^6/ml a buněčné kultury byly po každém měření naředěny na počáteční koncentraci. Růstový fenotyp byl porovnáván u neindukovaných buněk a u buněk s indukovanou RNAi. Byla spočítána kumulativní koncentrace představující nárůst koncentrace buněk během 6-8 dnů v teoretické lahvičce dostatečně velké na to, aby buněčné kultury nemusely být každý den ředěny. Kumulativní koncentrace byla pro každý den vypočítána vynásobením ředícího faktoru a naměřeným počtem buněk; ředící faktor je podíl naměřené a počáteční koncentrace. Růstová křivka byla vytvořena v programu GraphPad Prism 7.

$$\text{ředící } faktor = \text{naměřená } koncentrace/2x10^6$$

$$kumulativní\ koncentrace = \text{ředící } faktor * \text{naměřená } koncentrace$$

3.4 Nativní proteinová elektroforéza a aktivita proteinů

Nativní gradientová elektroforéza umožňuje separaci proteinů bez použití denaturačních činidel a při zachování konformace proteinových komplexů. Pomocí nativní elektroforézy jsme separovali mitochondriální komplexy, které jsme získali z mitochondrií pomocí hypotonické lýze z buněk za použití jehly. S gelem se separovanými proteiny byla provedena aktivační assay s roztokem obsahujícím NADH a NBT (nitroblue tetrazolium chlorid) a byla sledována NADH dehydrogenázová aktivita proteinů v gelu.

Buňky v množství $3{\times}10^8$ byly stočeny při 1300 × g na 10 min při 4 °C a resuspendovány v 1,5 ml chlazeného NET roztoku (0,15M NaCl, 0,1M EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8)) a znova stočeny. Dále byly buňky resuspendovány v 1,5 ml DTE (1mM Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA). K rozrušení buněk došlo protlačením směsi přes 25G jehlu, po kterém bylo okamžitě přidáno 180 µl 60 % roztoku sacharózy. Rozrušené buňky byly stočeny na 10 min při 15000 × g při 4 °C a supernatant byl odstraněn. Pelet byl resuspendován v 500 µl roztoku STM (250mM sacharóza, 20mM Tris pH8, 2mM $MgCl_2$). K peletu bylo přidáno 1,5 µl 1M $MgCl_2$, 1,5 µl 0,1M $CaCl_2$ a nakonec 0,7 µl DNasy (10 mg/ml). Následovala inkubace 1 hodinu. Aktivita DNasy byla zastavena přidáním 500 µl STE (250mM sacharóza, 20mM Tris (pH 8), 10mM EDTA). Směs organel včetně mitochondrií byla nakonec stočena při

15000 × g (10 min, 4 °C), omyta 500 µl STE a znova stočena. Pelety obsahující mitochondrie byly skladovány v -80 °C.

Izolované mitochondrie byly resuspendovány v 40 µl MLB pufru (750mM ACA, 50mM Bis-Tris pH 7, 0,5mM EDTA, 1× inhibitory proteáz) a bylo přidáno 10 µl 10% roztoku n-dodecyl-β-D-maltosidu (DDM). Následovala 1hodinová inkubace na ledu, poté byly lyzáty mitochondrií stočeny na 12 000 rpm (30 min, 4 °C). Ze supernatantu bylo kolorimetricky stanoveno množství proteinů pomocí BCA (bicinchoninic acid) assaye použitím komerčně dostupného kitu (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™). Absorbance vzorků byla stanovena při 562nm, vzorky byly naředěny s MLB pufrem v poměru 1:10 a 1:20 a jako referenční protein byl použit albumin z bovinního séra. Jako kontrola bylo odebráno 8 µg mitochondriálních proteinů na SDS PAGE elektroforézu, proteiny byly smíchány s MLB pufrem a s SDS nanášecím barvivem (MLB a SDS pufr v poměru 2:1). SDS PAGE elektroforéza byla provedena stejným způsobem jako je uvedeno v kapitole 3.2.3. Na high - resolution clear native PAGE bylo použito 40 µg proteinů. Roztok obsahoval 2 µl barviva (50 % glycerol, 0,1 % Ponceau S) a byl doplněn do 20 µl MLB pufrem. Roztok byl minimálně 10 minut inkubován na ledu. Proteiny byly naneseny do komerčního nativního gelu (3-12 % Bis-Tris NativePAGE™ Mini Protein Gel, Invitrogen™), byl použit katodový (15mM Bis-Tris pH 7, 50mM Tricin, 0,05 % DOC, 0,01 % DDM) a anodový (50mM Bis-Tris (pH 7)) pufr. Před naloadováním proteinů gel běžel 20 minut při 100 V a pokojové teplotě. Proteiny byly separovány 2-3 hodiny při 100 V a 4 °C. Nativní gel byl inkubován v aktivačním pufru (100mM Tris-HCl pH 7,4, 0,14mM NADH, 1mg/ml NBT) v Petriho misce, miska byla zakryta hliníkovou folií. Pufr obsahoval NADH a byla tak pozorována dehydrogenázová aktivita enzymů. Enzymatická aktivita byla sledována po 1 hod. a 12 hod. barvení.

3.5 Alamar blue assay

Alamar blue assay je metoda určující látkovou cytotoxicitu. Využívá modré barvivo resazurin, které má schopnost vstupovat do buněk, ale není pro buňky toxické. Resazurin je oxidačně-redukční činidlo, které se v redukčním prostředí živých buněk mění na resorufin a mění tak svou barvu v závislosti na množství žijících respirujících buněk. Resorufin má jasnou fluorescenční růžovou barvu a intenzita fluorescence se mění podle množství spotřebovávaného kyslíku v měřeném vzorku a indikuje buněčné metabolické funkce. Při této metodě je zjišťována hodnota EC50 určující koncentraci inhibitoru, která je potřeba k inhibici aktivity specifického enzymu a zabití 50 % populace buněk. V tomto experimentu byl použit rotenon, inhibitor komplexu I.

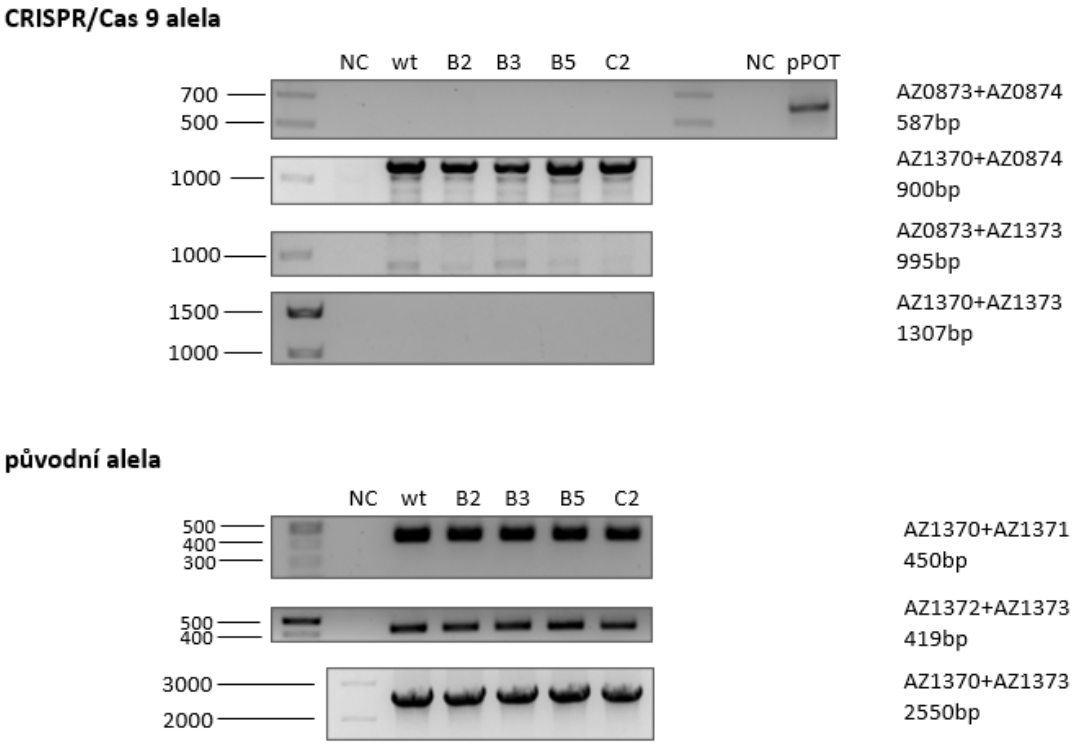
Při alamar blue assayi byla zjišťována cytotoxicita rotenonu, měření probíhalo v 96 jamkové destičce. Nejvyšší koncentrace rotenonu byla 150 µM, rotenon byl ředěn 2× ředící řadou v deseti jamkách v objemu 100 µl, nejnižší koncentrace byla 0,293 µM. Buňky v objemu 100 µl byly smíchány se 100 µl roztoku rotenonu, finální koncentrace buněk byla 1×10^5 na jamku. Inkubace buněk v destičce při 27 °C probíhala 48 hodin, poté bylo přidáno 20 µl resazurinu (finální koncentrace 50 µM, pH 7,3) a buňky byly inkubovány dalších 24 hodin. Nakonec byla měřena fluorescence při 590nm. K analýze dat byl použit program GraphPad Prism a funkce nelineární regrese, koncentrace rotenonu byla logaritmována.

4. Výsledky

4.1 CRISPR/Cas9 knock-out podjednotky NDUFA6 v RBP6$^{O/E}$ linii nebyl úspěšný

Ke zjištění významnosti aktivity komplexu I během diferenciace jsme se rozhodli provést knock-out jedné z podjednotek komplexu I pomocí CRISPR/Cas9 systému. Byla vybrána podjednotka NDUFA6, jejíž delece v kvasinkách vedla k narušení dehydrogenázové funkce komplexu I (Angerer et al., 2014). Pokus o knock-out byl proveden v buňkách linie RBP6$^{O/E}$, u nichž lze indukovat diferenciaci pomocí tetracyklinu. Cílem bylo vytvořit linii buněk s nefunkčním komplexem I na pozadí RBP6 exprese a předpokladem bylo narušení schopnosti buněk se diferencovat. Do buněk byl nejprve transfekován plasmid pAi1C9 sloužící jako templát pro expresi Cas9 enzymu a T7 RNA polymerázy. Klony byly selektovány pomocí blasticidinu (10μg/ml) a následně byla provedena druhá transfekce. Při druhé transfekci byly do buněk vloženy DNA fragmenty selekční puromycinové kazety a templátů pro *in-vivo* transkripci naváděcích RNA (5'sgRNA a 3'sgRNA) získané PCR reakcí. Klony byly selektovány pomocí puromycinu a poté byla izolována genomová DNA. Úspěšnost inkorporace puromycinové kazety a knock-out NDUFA6 genu byly testovány provedením několika PCR reakcí s genomovou DNA získaných klonů B2, B3, B5 a C2.

Na obrázku agarózových gelů lze vidět, že ani u jednoho z klonů nedošlo k inkorporaci modifikované kazety obsahující selekční marker. Zároveň všechny klony měly zachovanou celou původní NDUFA6 alelu (Obr. 13). Metoda knock-outu alely podjednotky NDUFA6 metodou CRISPR/Cas9 tak nebyla úspěšná.

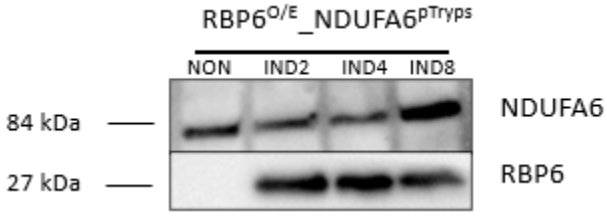


Obr. 13: Agarózové gely s produkty PCR reakcí ověřujících modifikaci NDUFA6 alely pomocí CRISPR/Cas9 metody. Vpravo jsou uvedeny použité primery a očekávaná velikost produktu. Jako kontrola (wt) byly použity buňky parentální linie RBP6$^{O/E}$, negativní kontrola – NC.

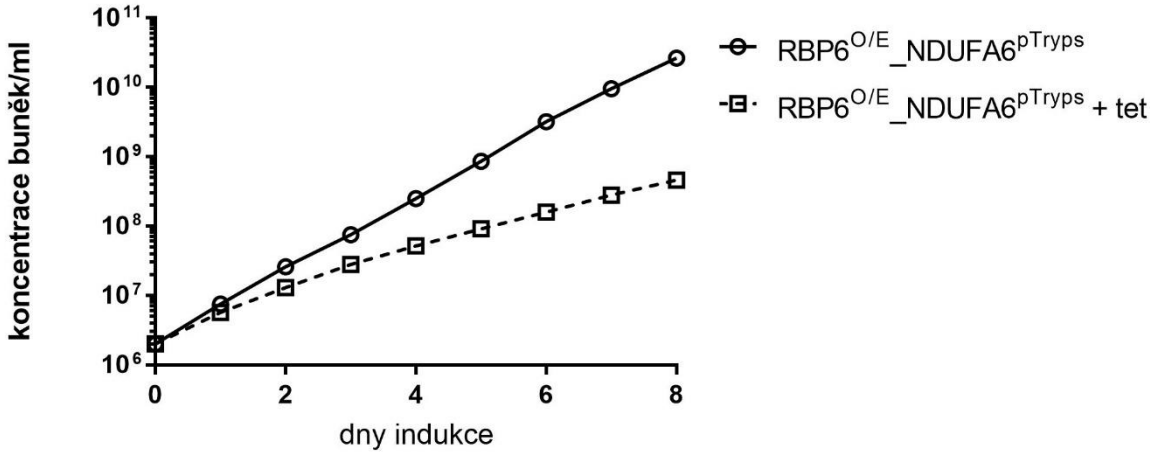
4.2 Vytvoření linií s RNAi podjednotky NDUFA6 na pozadí 29-13 využitím vektoru pTrypson, ale selhání přístupu na pozadí RBP6$^{O/E}$

Pro vytvoření linie bez aktivity komplexu I na pozadí RBP6 exprese indukující diferenciaci jsme po neúspěšnosti metody CRISPR/Cas9 přistoupili k metodě RNAi. Cílem bylo získat linii se sníženým množství podjednotky NDUFA6, u níž vlivem ztráty komplexu I nedojde k indukci diferenciace. Jako vektor byl zvolen pTrypson generující dvouvláknovou RNA při indukci tetracyklinem cílenou na kódující část NDUFA6 podjednotky. Vektor pTrypson pro RNAi genu NDUFA6 byl transfekován do buněk linie RBP6$^{O/E}$ a buňky byly selektovány po dobu cca 3 týdnů. Z buněk byly následně získány celobuněčné lyzáty, které byly použity na SDS-PAGE elektroforézu a buňky byly otestovány na přítomnost proteinů NDUFA6 a RBP6.

U získaných buněk RBP6$^{O/E}$_NDUFA6^{pTryps} došlo po indukci tetracyklinem ke zvýšené expresi RBP6 proteinu, jež byla detekována protilátkou k RBP6 proteinu (Obr. 14). Pozorovaná exprese RBP6 zároveň korelovala s projevem růstového fenotypu, kdy došlo ke snížení proliferace buněk, což značí indukci diferenciace (Obr. 15) Tento růstový fenotyp je příznačný pro diferencující se linii RBP6$^{O/E}$ (Obr. 19) (Doleželová et al., 2020). Bohužel nedošlo ke snížení množství podjednotky NDUFA6 detekované NDUFA6 protilátkou (Obr. 14). RNAi využívající vektor indukující vlásenkovou dvouvláknovou RNA tak nebyla v RBP6$^{O/E}$ linii úspěšná.

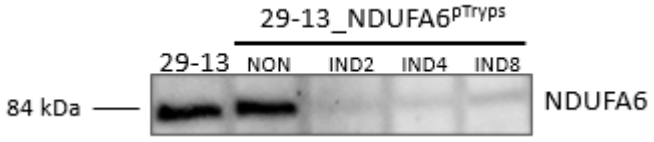


Obr. 14: Western blot s celobuněčnými lyzáty linie RBP6$^{O/E}$ _NDUFA6^{pTryps}, k vizualizaci proteinů byly použity protilátky anti-NDUFA6 a anti-RBP6. Indukce pomocí tetracyklinu probíhala 8 dní.

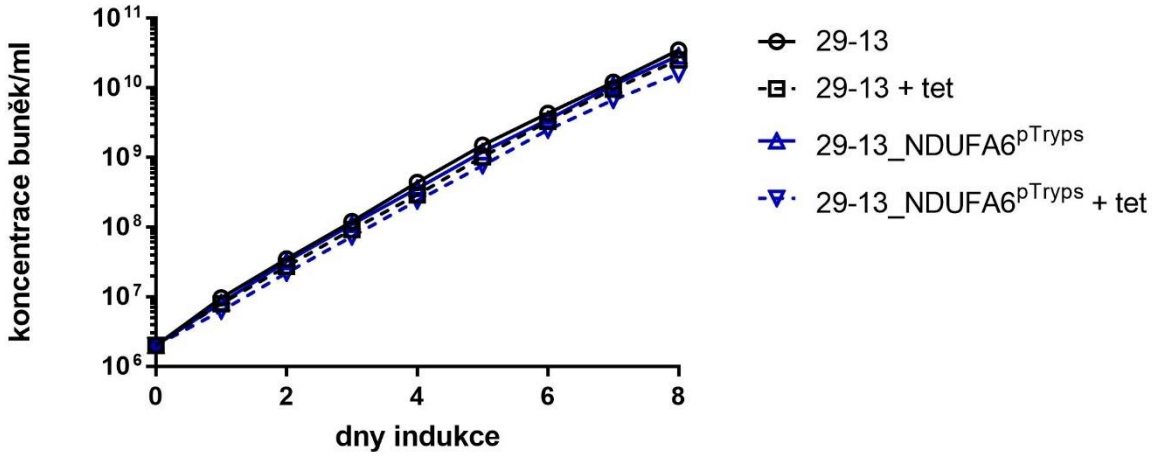


Obr. 15: Růstová křivka linie RBP6$^{O/E}$ _NDUFA6^{pTryps} během 8denní tetracyklinové indukce RNAi NDUFA6 a exprese RBP6.

Pro kontrolu, zda je vytvořený vektor pTrypson funkční, jsme se rozhodli pro transfekci do linie 29-13. Byla tak vytvořena linie 29-13_NDUFA6^{pTryps}, u níž lze indukovat RNAi proti genu NDUFA6. V případě linie 29-13_NDUFA6^{pTryps} byla RNAi pomocí pTrypsonu úspěšná a již od druhého dne indukce byl pozorován výrazný pokles množství NDUFA6 proteinu (Obr. 16). Lze tak předpokládat, že vektor byl v pořádku a selhání RNAi v linii RBP6$^{O/E}$ bylo způsobeno něčím jiným. Na růstový fenotyp neměla RNAi v linii 29 - 13_NDUFA6^{pTryps} žádný vliv, buňky v médiu rostly stejně jako parentální linie 29-13 (Obr. 17).



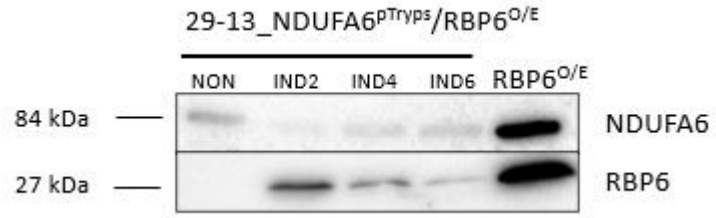
Obr. 16: Western blot ukazující detekci NDUFA6 proteinu s protilátkou k NDUFA6 k ověření RNAi genu NDUFA6 při použití vektoru pTrypson u buněk linie 29-13. Indukce probíhala 6 dní, jako kontrola byla použita parentální linie 29-13.



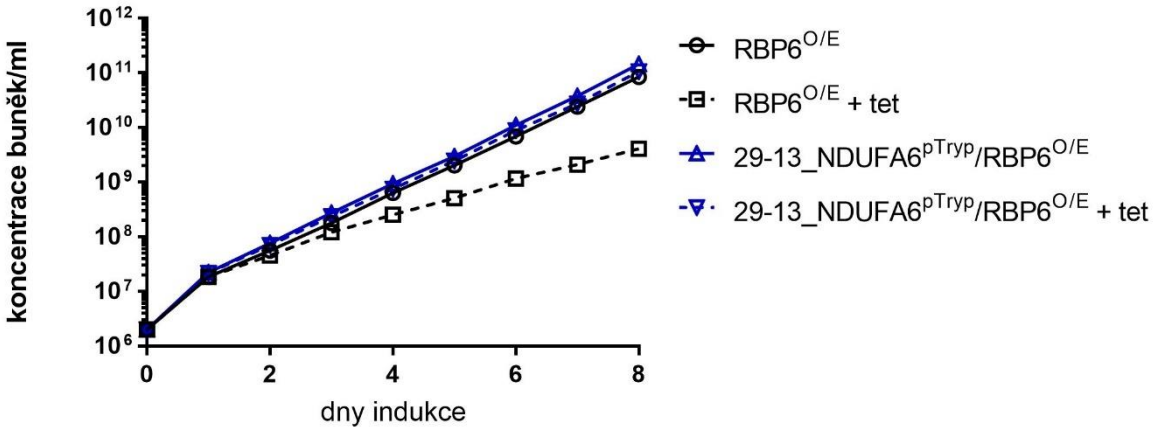
Obr. 17: Růstová křivka buněk linie 29-13_NDUFA6^{pTryps} (modrá křivka) během 8denní tetracyklinové indukce RNAi, jako kontrola byly použity buňky parentální linie 29-13 (černá křivka).

Jako další krok jsme provedli obrácený postup, kdy jsme do linie 29 - 13_NDUFA6^{pTryps}, u níž RNAi fungovala správně, vložili konstrukt pro indukci exprese proteinu RBP6. Byl použit stejný konstrukt jako k vytvoření RBP6$^{O/E}$. Cílem bylo zajistit, že RNAi bude zachována a zároveň bude možné indukovat buněčnou diferenciaci. Tato buněčná linie byla nazvána 29-13_NDUFA6^{pTryps}/RBP6$^{O/E}$. Na obrázku western blotu lze vidět, že RNAi je stále funkční, nicméně nedochází ke zvýšené expresi RBP6 proteinu (Obr. 18). Tato skutečnost koreluje s absencí růstového fenotypu (Obr. 19). Růst indukovaných a neindukovaných buněk je stejný a nevykazuje znaky probíhající diferenciace, které lze pozorovat u linie RBP6$^{O/E}$ (Obr. 19).

Použitím vektoru pTrypson se tedy nepodařilo dosáhnout snížení množství proteinu NDUFA6 na pozadí RBP6$^{O/E}$ a nebyla získána linie bez aktivního komplexu I, u níž by bylo možné indukovat diferenciaci. Problémem tohoto přístupu je pravděpodobně duální využití stejného inducibilního systému, kdy indukce jak RNAi, tak exprese RBP6 jsou spuštěny pomocí tetracyklinu. Metoda RNAi tedy není vhodným nástrojem k ověření role komplexu I během diferenciace.



Obr. 18: Western blot s celobuněčnými lyzáty linie 29-13_NDUFA6^{pTryps}/RBP6$^{O/E}$ s funkční RNAi genu NDUFA6 použitím vektoru pTrypson. Indukce RNAi probíhala 6 dní a jako kontrola byla použita parentální linie RBP6$^{O/E}$ po dvoudenní indukci exprese proteinu RBP6.

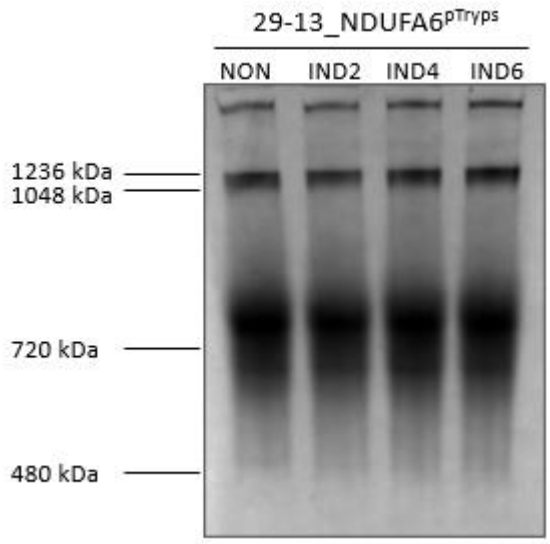


Obr. 19: Růstová křivka linie 29-13_NDUFA6^{pTryps}/RBP6$^{O/E}$ během tetracyklinové indukce RNAi a nefunkční RBP6 overexprese. Jako kontrola růstového fenotypu RBP6 exprese byly indukovány buňky linie RBP6 $^{O/E}$.

4.3 Snížení exprese NDUFA6 podjednotky nemá vliv na NADH dehydrogenázovou aktivitu detekovanou pomocí nativní elektroforézy

V linii 29-13_NDUFA6^{pTryps} se nám podařilo výrazně snížit přítomnost podjednotky NDUFA6. Dalším krokem bylo zjistit, zda má ztráta této podjednotky vliv na NADH dehydrogenázovou aktivitu komplexu I. Předpokladem bylo, že aktivita komplexu I bude snížená stejně jako tomu bylo v kvasinkách (Angerer et al., 2014).

Byla provedena nativní gelová elektroforéza s proteiny z lyzovaných mitochondrií linie 29-13_NDUFA6^{pTryps}. Na obrázku nativního gelu lze vidět silný band enzymu s NADH dehydrogenázovou aktivitou, který velikostně odpovídá komplexu I (1 – 1,2 MDa) (Obr. 20). Podle bandů lze usuzovat, že enzymatická aktivita se během indukce RNAi genu NDUFA6 nemění a je stejná jak v neindukovaných buňkách, tak v buňkách po 2denní, 4denní i 6denní indukci. Ztráta podjednotky NDUFA6 tak zřejmě nemá vliv na aktivitu komplexu I a komplex zůstává aktivní. Druhým možným vysvětlením je, že band vykazující NADH dehydrogenázovou aktivitu není komplexem I a je vizualizována jiná mitochondriální NADH dehydrogenáza.

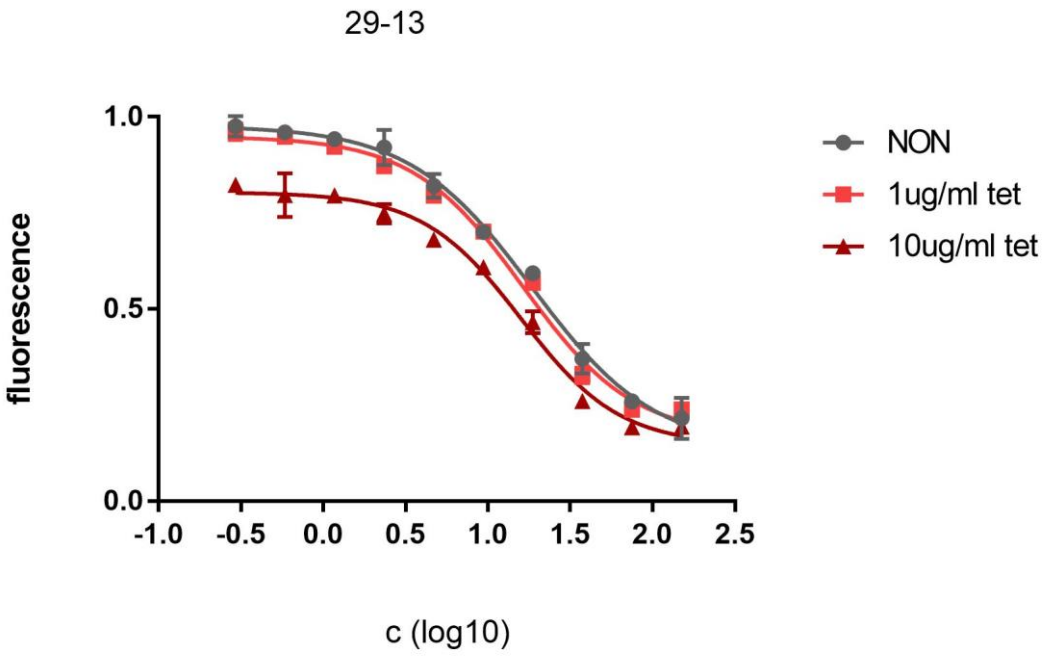


Obr. 20: NADH dehydrogenázová aktivita proteinů v nativním gelu u buněk 29 - 13_NDUFA6^{pTryps}. Očekávaná velikost komplexu I je mezi 1-1,2MDa.

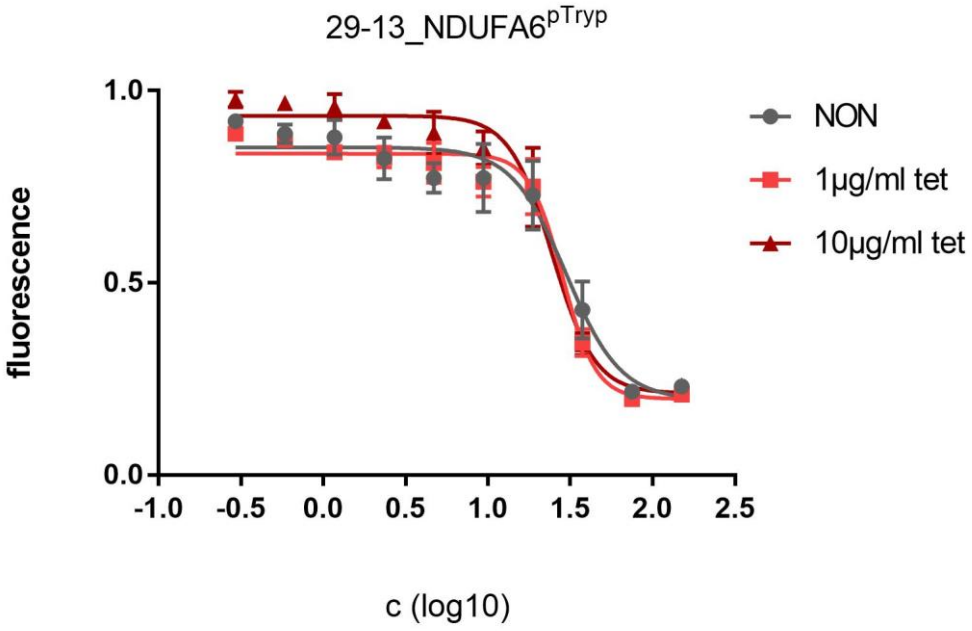
4.4 Senzitivita na rotenon není při deleci NDUFA6 podjednotky zvýšená

Linie 29-13_NDUFA6^{pTryps} postrádá NDUFA6 podjednotku, nicméně jsme nepozorovali snížení NADH dehydrogenázové aktivity v nativním gelu. Proto jsme se rozhodli otestovat senzitivitu buněk na rotenon, inhibitor komplexu I. Pokud by se projevilo, že buňky jsou méně sensitivní na tento inhibitor, pak by ztráta NDUFA6 ovlivňovala funkci komplexu I. Taky by se poukázalo na možnost, že funkce komplexu I má v buňkách nějaký význam, i přesto, že nebyl pozorován žádný růstový fenotyp.

Nejprve byla alamar blue assay provedena s buňkami linie 29-13 v médiu bez tetracyklinu, s tetracyklinem o koncentraci 1μg/ml a s tetracyklinem o koncentraci 10μg/ml (Obr. 21). Cílem bylo vyloučit vliv tetracyklinu na fluorescenci. Buňky 29-13_NDUFA6^{pTryps} byly otestovány pomocí alamar blue assaye rovněž s tetracyklinem o koncentracích 0μg/ml, 1μg/ml a 10μg/ml v médiu (Obr. 22). Hodnoty EC50 pro linii 29-13 byly 18,5 μM (0μg/ml tet), 16,3 μM (1μg/ml tet) a 15,9 μM (10μg/ml tet). Naměřená EC50 v médiu s nejkoncentrovanějším tetracyklinem je tak mírně snížená, ale rozdíl je prakticky zanedbatelný, a tak se můžeme domnívat, že tetracyklin nemá na měření senzitivity na rotenon vliv. U buněk linie 29-13_NDUFA6^{pTryps} byl u hodnot EC50 pozorován podobný trend - 29,8 μM (0μg/ml), 28,3 μM (1μg/ml tet) a 24,5 μM (10μg/ml tet). Buňky s indukovanou RNAi (s tetracyklinem) tak nejsou více senzitivní na rotenon. Opět se tak potvrdilo, že absence proteinu NDUFA6 nemá pravděpodobně vliv na funkci komplexu I. Podjednotka NDUFA6 tak není vhodná na experimenty sledující aktivitu komplexu I a jeho důležitost v *T. brucei.*



Obr. 21: Senzitivita na rotenon měřená pomocí alamar blue assaye u linie 29-13. Hodnoty fluorescence byly normalizovány, koncentrace rotenonu byla logaritmována.

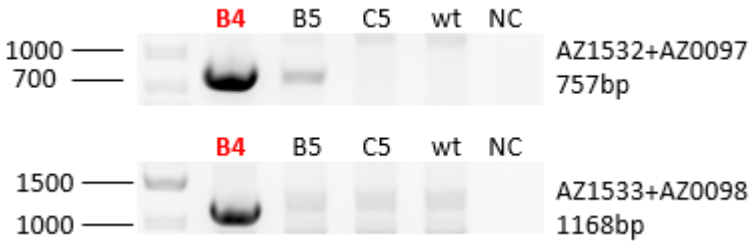


Obr. 22: Senzitivita na rotenon měřená pomocí alamar blue assaye u linie 29-13_NDUFA6^{pTryp}. Senzitivita je u neindukovaných i indukovaných buněk stejná. Hodnoty fluorescence byly normalizovány, koncentrace rotenonu byla logaritmována.

4.5 Úspěšná delece jedné alely genu NUBM v divoké linii Lister 427

Použití podjednotky NDUFA6 ke studování komplexu I nebylo úspěšné, a tak jsme přikročili k jiné podjednotce komplexu I. Zvolili jsme podjednotku, která má přímou vazbu na enzymatickou aktivitu komplexu I a účastní se oxidace NADH – podjednotku NUBM. Metoda RNAi nemůže být použita, protože v předchozích experimentech jsme zjistili, že přístup indukce RNAi a zároveň exprese proteinu RBP6 stejným inducibilním systémem není vhodná. K vypnutí exprese této podjednotky jsme tudíž vybrali metodu double knock-out v procyklické linii Lister 427. Tato linie je vhodná k vytvoření double knock-outu za použití dvou selekčních markerů (na každou alelu jiný), protože neobsahuje žádné selekční markery, a může být do buněk následně také vložena kazeta pro RBP6 expresi. Vznikne tak buněčná linie, u níž bude možné sledovat vliv absence komplexu I na diferenciaci.

K vyřazení jedné NUBM alely byl do buněk při transfekci vložen konstrukt s geny pro T7 RNA polymerázu a neomycinovou rezistenci. Klony, u nichž došlo pomocí homologní rekombinace k nahrazení NUBM alely naším konstruktem, byly selektovány neomycinem a poté z nich byla izolována genomová DNA. S DNA byly provedeny PCR reakce ověřující inkorporaci konstruktu na specifické místo (Obr. 23). Delece jedné NUBM alely a vložení konstruktu úspěšně proběhlo v klonu B4, což bylo potvrzeno amplifikací produktů o správné velikosti v místech 5‘ UTR a 3‘ UTR integrace (Obr. 23). Linie Lister 427 single knock-out pro gen NUBM byla tedy úspěšné vytvořena. Druhá alela bude nahrazena konstruktem s geny pro tetracyklinový represor a hygromycinovou rezistenci. Z časových důvodů tento experiment ještě není dokončen a není tudíž součástí této práce.

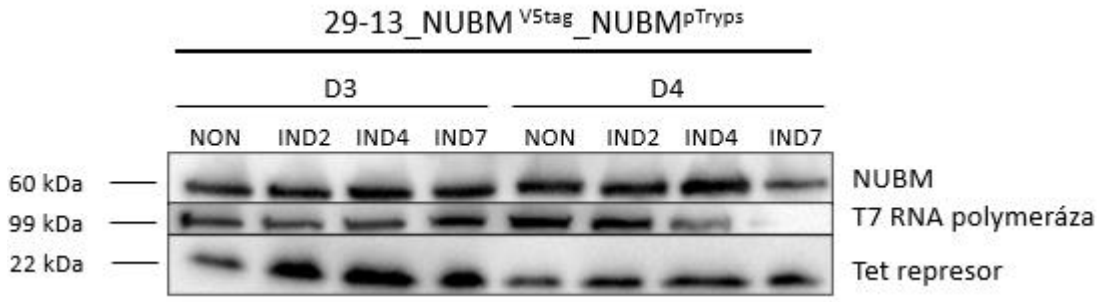


Obr. 23: Agarózový gel s produkty PCR reakcí ověřující knock-out alely NUBM. Primery AZ1532 a AZ0097 nasedaly v místě 5‘ UTR inkorporace a primery AZ1533 a AZ0098 v místě 3‘ UTR inkorporace. Knock-out byl úspěšný v klonu B4.

4.6 RNA interference NUBM podjednotky pomocí pTrypson vektoru se nezdařila

V průběhu časově zdlouhavé přípravy double knock-outu genu NUBM jsme začali pracovat na přípravě RNAi linie pro NUBM podjednotku v buňkách 29-13_NUBM^{V5tag} za použití vektoru pTrypson. Tato linie má jednu alelu NUBM genu otagovanou V5 značkou, a tudíž výsledný protein NUBM lze snadno detekovat pomocí specifické anti-V5 protilátky. Důvodem těchto experimentů bylo ověření důležitosti NUBM podjednotky pro strukturální integritu komplexu I a jeho NADH-oxidázovou aktivitu v procyklických formách *T. brucei*.

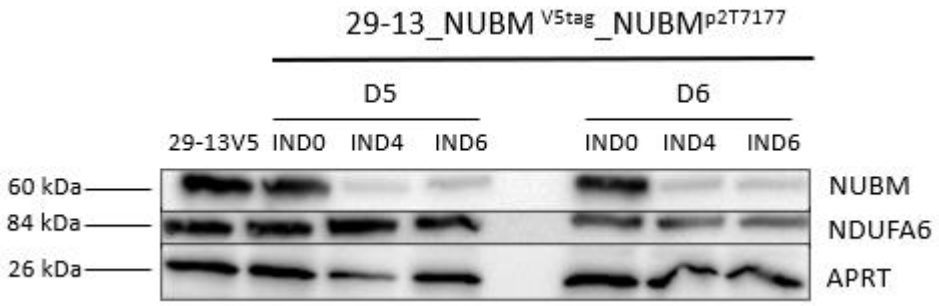
U klonů D3 a D4 linie 29-13_NUBM ^{V5tag}_NUBM^{pTryps} byla RNAi podjednotky NUBM indukována 7 dní a následně byly klony pomocí western blotu otestovány na množství přítomného proteinu NUBM. Na obrázku můžeme vidět, že množství NUBM se během RNAi ani u jednoho z klonů nesnížilo (Obr. 24). Otestovali jsme tedy, zda se v této linii exprimuje dostatečné množství T7 RNA polymerázy a tetracyklinového represoru, jež jsou pro úspěšnost RNAi zásadní. Množství tetracyklinového represoru je v obou klonech stabilní. Hladina T7 RNA polymerázy se od 4. dne u klonu D4 snižuje, což může být způsobeno problémem spíše technického rázu, například nedostatečnou vazbou protilátky na membránu, neboť v případě klonu D3 je hladina proteinu v průběhu indukce stabilní (Obr. 24). Závěrem lze konstatovat, že použití vektoru pTrypson k RNAi podjednotky NUBM nebylo úspěšné.



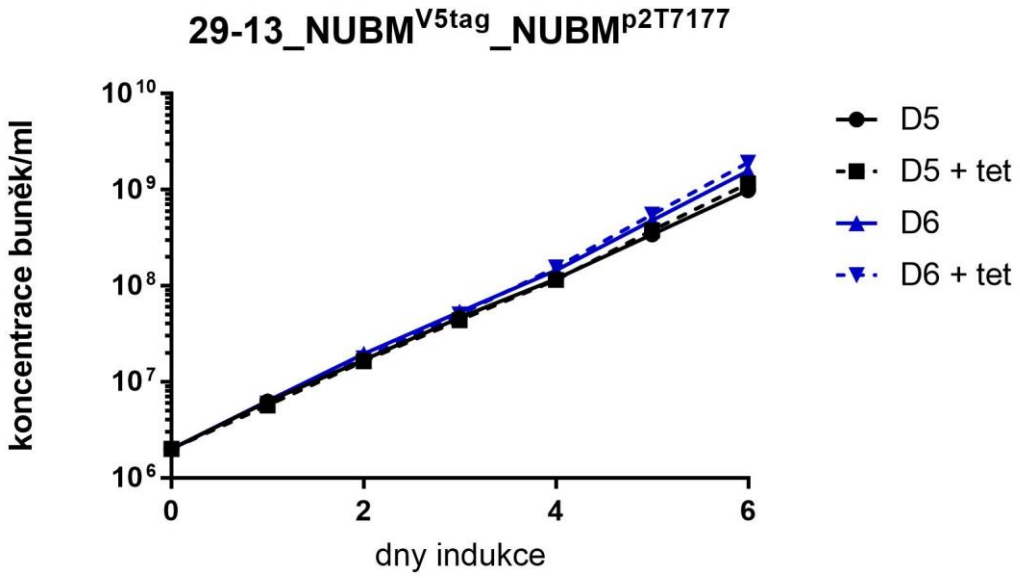
Obr. 24: Western blot ověřující funkčnost systému RNAi použitím vektoru pTrypson.

4.7 Snížení hladiny podjednotky NUBM pomocí RNAi s použitím p2T7-177 vektoru na pozadí 29-13_NUBM^{V5tag} linie

Selhání vektoru pTrypson při RNAi NUBM nás přivedlo k použití jiného vektoru, a to p2T7-177. Do buněk 29-13_NUBM^{V5tag} byl transfekován vektor p2T7-177 sloužící ke generaci dvouvláknové RNA cílené na NUBM podjednotku. Buňky byly selektovány phleomycinem (10µg/ml) a u zdárných selektovaných klonů D5 a D6 byla indukována RNAi pomocí tetracyklinu. Indukované buňky byly zlyzovány a lyzáty byly použity na verifikaci množství proteinů pomocí western blotů. Hladina NUBM podjednotky je u obou klonů D5 a D6 linie 29-13_NUBM^{V5tag}_NUBM^{p2T7177} zřetelně snížená (Obr. 25). Množství další podjednotky komplexu I, NDUFA6, ovlivněno není. Jako kontrola celkového množství proteinů, které byly naneseny na membránu, byla zkontrolována hladina adenin fosforibosyl transferázy (APRT) a její množství je u vzorků stabilní, vyjma indukčního dne 4 u klonu D5. Nicméně i u této odchylky v množství nanesené směsi proteinů je úspěšnost RNAi průkazná (Obr. 25). U linie 29-13_NUBM^{V5tag}_NUBM^{p2T7177} se tedy podařilo zdárně indukovat RNAi podjednotky NUBM. Při sledování růstového fenotypu během indukce RNAi bylo pozorováno, že ztráta NUBM podjednotky nemá na buňky vliv a fenotyp je stejný u indukovaných i neindukovaných buněk obou klonů D5 a D6 (Obr. 26). Na základě tohoto pozorování se můžeme domnívat, že ztráta podjednotky NUBM klíčové pro dehydrogenázovou aktivitu komplexu I není pro buňky fatální a že enzymatická aktivita komplexu I není esenciální.



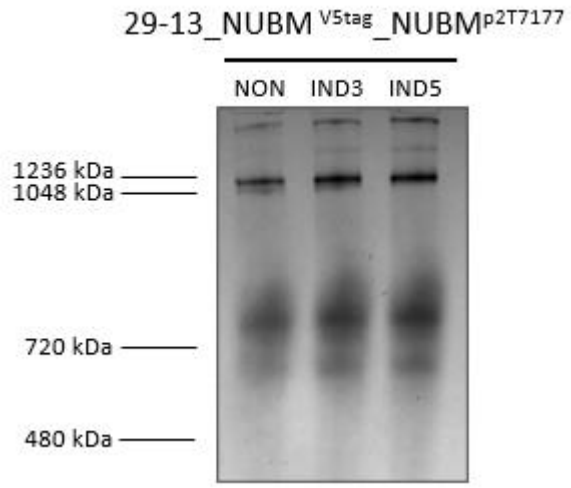
Obr. 25: Western blot ověřující úspěšnost RNAi NUBM pomocí p2T7-177. Byly naneseny protilátky anti-V5 (NUBM), anti-NDUFA6 (NDUFA6) a anti-APRT (APRT). RNAi byla indukována 6 dnů u dvou vybraných klonů (D5, D6). Jako kontrola byly použity buňky parentální linie 29-13_NUBM ^{V5tag} (29 - 13V5).



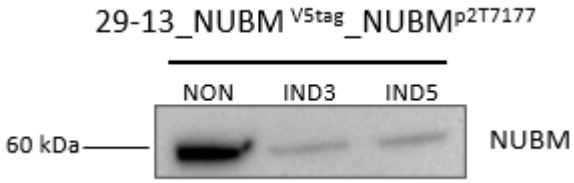
Obr. 26: Růstová křivka klonů D5 (černá křivka) a D6 (modrá křivka) linie 29 - 13_NUBM^{V5tag}_NUBM ^{p2T7177} během 6denní indukce RNAi podjednotky NUBM. Mezi indukovanými a neindukovanými buňkami nebyl pozorován žádný rozdíl.

4.8 NADH dehydrogenázová aktivita komplexu I v nativním gelu není průkazná

Linii s fungující RNAi podjednotky NUBM jsme se rozhodli otestovat na dehydrogenázovou aktivitu komplexu I v nativním gelu s předpokladem, že absence NUBM podjednotky způsobí neschopnost komplexu I provádět svou katalytickou aktivitu a oxidaci NADH a band v oblasti ~ 1MDa nebude u buněk s indukovanou RNAi detekovatelný. Z linie 29-13_NUBM ^{V5tag}_NUBM^{p2T7177} byly izolovány mitochondriální lyzáty a v nativním gelu byly detekovány proteiny s NADH dehydrogenázovou aktivitou. V gelu je zřetelný band v oblasti nad 1 MDa, o kterém jsme předpokládali, že představuje komplex I, stejně výrazný u neindukovaných i indukovaných buněk (Obr. 27). Tento band dehydrogenázové aktivity tak buď není způsoben aktivitou komplexu I anebo absence podjednotky NUBM nemá na katalytickou funkci komplexu I vliv. Mitochondriální lyzáty jsme rovněž otestovali pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu s protilátkou proti V5 značené NUBM za účelem potvrzení funkční RNAi v testovaných liniích (Obr. 28). Závěrem můžeme tvrdit, že pomocí nativní elektroforézy se nepodařilo zjistit vliv RNAi na funkci komplexu I a zda je NUBM podjednotka esenciální pro funkci komplexu I.



Obr. 27: Nativní gel s linií 29-13_NUBM ^{V5tag}_NUBM ^{p2T7177} s neindukovanou RNAi, s 3denní a 5denní indukci RNAi podjednotky NUBM (NON, IND3, IND5). NADH dehydrogenázová aktivita proteinů se u indukovaných buněk nemění.



Obr. 28: Western blot s linií 29-13_NUBM ^{V5tag}_NUBM ^{p2T7177} s neindukovanou RNAi, s 3denní a 5denní indukci RNAi podjednotky NUBM (NON, IND3, IND5), byla použita protilátka proti V5 značce, která je připojena k NUBM proteinu. Experiment potvrdil funkční RNAi NUBM.

5. Diskuse

Záměrem této práce bylo studium role komplexu v rámci diferenciace hmyzích forem *T. brucei*. Jedná se o hypotézu opírající se o dřívější pokusy v naší laboratoři, kdy bylo pozorováno navýšení respirace projevující se vyšší spotřebou prolinu a oxidací sukcinátu vedoucí k hyperpolarizaci mitochondriální membrány a také nárůstu produkce mitochondriálního superoxidu v diferencujících se buňkách $RBP6^{O/E}$ (Doleželová et al., 2020). Pomocí nativní elektroforézy byla rovněž detekována zesílená NADH dehydrogenázová aktivita v oblasti ~ 1MDa, jež byla přisuzována komplexu I. Na základě těchto experimentů jsme tedy vyvozovali, že by aktivita komplexu I mohla hrát roli v průběhu diferenciace.

U linií s RNAi eliminovanými podjednotkami NDUFA6 a NUBM jsme pozorovali NADH dehydrogenázovou aktivitu v nativním gelu a detekovaný band o velikosti ~ 1MDa byl vyhodnocen jako aktivní komplex I. Nicméně ani u jedné z linií nedošlo k zeslabení této aktivity (Obr. 20, 27). Jedním z důvodů by mohla být nevhodná volba eliminovaných podjednotek, jejímž důsledkem by byl nulový efekt na aktivitu komplexu I. V případě podjednotky NDUFA6 by to mohlo být možným vysvětlením, i když ztráta podjednotky NDUFA6 byla dříve klasifikována jako fatální pro katalytickou aktivitu komplexu I v kvasinkách, nicméně významnost této podjednotky pro komplex I *T. brucei* potvrzena nebyla (Angerer et al., 2014; Duarte & Tomás, 2014). Mohli bychom se tedy domnívat, že katalytická aktivita komplexu I nebyla poklesem NDUFA6 podjednotky ovlivněna. Nejasná ovšem zůstává otázka, proč nedošlo k narušení dehydrogenázové aktivity při absenci podjednotky NUBM. NUBM se vyskytuje ve všech identifikovaných komplexech I napříč organismy a je jednou z centrálních podjednotek. Obsahuje koenzym FMN a Fe-S klastry, její struktura je konzervovaná a představuje vstupní místo elektronů z NADH (Opperdoes & Michels, 2008). Eliminace této podjednotky by měla vyloučit NADH dehydrogenázovou aktivitu komplexu I a důvod, proč nebyl pozorován pokles této aktivity v předpokládané velikosti 1MDa, může být způsoben nedostatečnou specificitou použité metody k detekci komplexu I.

Přímé barvení NADH dehydrogenázové aktivity v gelu probíhá na základě reakce, kdy nitrotetrazolium modř (NTB) funguje jako artificiální finální akceptor elektronů a při její redukci dochází k tvorbě fialových precipitátů (Ponti, Dianzani, Cheeseman, & Slater, 1978). Tato metoda je ke sledování NADH oxidoreduktázové aktivity běžně používána, nicméně její specificita je diskutabilní, neboť potvrzení detekce aktivity komplexu I bývá problémové.

NADH:NTB aktivita může být detekována také pro jiné NADH-závislé mitochondriální dehydrogenázy, např. pro 2-oxoglutarát dehydrogenázu (OGDC). OGDC navíc v nativním gelu migruje poblíž komplexu I (Acestor et al., 2011; Surve et al., 2012; Verner et al., 2014). V případě Acestor et al., 2011 byla NTB-barvená aktivita detekována v oblasti kolem 1MDa, ale bylo zjištěno, že v této oblasti se nachází podjednotky jak komplexu I, tak OGDC. Lze tedy vyvozovat, že námi sledovaný band v oblasti kolem 1MDa je tvořen převážně OGDC a rozdíl v aktivitě u RNAi indukovaných a neindukovaných buněk nemohl být detekován. V krevní formě *T. brucei* v Surve et al., 2012 byla podjednotka NUBM v nativním 4–12 % gelu pomocí protilátky detekována v oblasti 720 kDa, avšak dehydrogenázová aktivita v odpovídající oblasti zaznamenána nebyla. Je třeba zmínit, že migrace komplexů nativním gelem je ovlivněna typem použitého gelu, případně použitých detergentů. Nejvýraznější aktivita byla ve stejné studii detekována v oblasti ~ 500 kDa, ale při ověření pomocí protilátky byla i tato aktivita spojena s dihydrolipoamid dehydrogenázou, která je sdílena čtyřmi proteinovými komplexy, jedním z nichž je OGDC (Roldán, Comini, Crispo, & Krauth-Siegel, 2011). Dosavadní výsledky tudíž naznačují, že NADH dehydrogenázová aktivita specifická pro komplex I zatím pozorována nebyla a že sledování aktivity komplexu I v nativním gelu je náročným úkolem, jejž je třeba optimalizovat. K ověření námi pozorovaných bandů v nativním gelu je potřeba udělat Blue Native PAGE se specifickou protilátkou anti-V5, při které by byla zjištěna velikost komplexu I v nativním gelu. Proteiny, které se v oblasti o velikosti 1MDa nacházejí, by mohly být prověřeny hmotnostní spektrometrií, která by umožnila identifikaci přítomných proteinových komplexů. Je pravděpodobné, že detekce aktivity komplexu I v nativním gelu je limitována jeho velikostí a vysokou hydrofobitou, která je vyšší než u jiných eukaryot, a možností, že intaktní komplex I není schopen proniknout do gelu.

Senzitivita na rotenon u buněk s RNAi podjednotky NDUFA6 nebyla ovlivněna. Předpokládali jsme, že buňky s RNAi budou mít menší senzitivitu na rotenon jako důsledek ztráty aktivního komplexu I. Hodnoty EC50 byly u buněk 29-13 ~ 16μM rotenonu a u buněk s RNAi ~ 25μM. Buňky s RNAi NDUFA6 tak měly asi 1,5× vyšší EC50 hodnoty koncentrace rotenonu, avšak neprojevil se signifikantní rozdíl mezi buňkami s indukovanou a neindukovanou RNAi (Obr. 21, 22). Rozdíl byl tedy pravděpodobně způsoben odlišnostmi v technickém provedení jednotlivých experimentů. K potvrzení tohoto předpokladu by bylo třeba udělat pokus v biologických triplikátech. Já jsem pokus neopakovala, protože se neprokázal vliv RNAi na senzitivitu na rotenon a opakování pokusu bylo bezpředmětné.

Podjednotka NDUFA6 tak pravděpodobně nemá vliv na aktivitu komplexu I a v další studii by bylo příhodné otestovat vliv rotenonu na buňky bez podjednotky NUBM, jež se přímo podílí na NADH aktivitě komplexu I.

Ke studiu komplexu I během diferenciace, jehož role v *T. brucei* zůstává neobjasněna, je potřeba vytvořit linie, které postrádají komplex I a zároveň jsou schopné indukce diferenciace. Nejčistším způsobem vyřazení alel specifického genu je pomocí knock-outu, který jsme se pokusili provést metodou CRISPR/Cas9 v linii RBP6$^{O/E}$. Metoda CRISPR/Cas9 je k editaci genomu široce využívána. Linie RBP6$^{O/E}$ je limitována dostupností selekčních markerů, protože již obsahuje tři selekční kazety (neomycin, hygromycin a phleomycin) a posledním použitelným markerem je puromycin a blasticidin. Byla tedy zvolena transientní CRISPR/Cas9 metoda, jejíž výhoda spočívá v transientní expresi Cas9 enzymu a T7 RNA polymerázy a nevyžaduje jejich stabilní integraci do genomu parazita. Naproti tomu její nevýhodou je nižší úspěšnost při získávání klonů ve srovnání s liniemi se stabilně integrovanými geny pro Cas9 a T7 RNA polymerázu (Shaw et al., 2020). Bohužel náš pokus o knock-out NDUFA6 podjednotky metodou CRISPR/Cas9 úspěšný nebyl, jelikož se nám nepodařilo eliminovat ani jednu z alel. Důvodem by mohla být nedostatečná exprese Cas9 enzymu anebo T7 RNA polymerázy, která způsobila neefektivní specifickou integraci opravné kazety. Avšak záhadou zůstává rezistence získaných klonů vůči selekčnímu puromycinu. Relevantním přístupem by bylo tento pokus s transientní CRISPR/Cas9 zopakovat.

Selhání metody CRISPR/Cas9 pro vytvoření nulového mutanta pro komplex I nás přivedlo ke klasické metodě double knock-out pomocí homologní rekombinace, kdy dojde k výměně alel podjednotky komplexu I kazetami obsahujícími selekční marker. Tato metoda nebyla zvolena jako první možnost kvůli své časové náročnosti. Vytvoření linie metodou double knock-out trvá v průměru 8 měsíců. Vzhledem k tomu, že RBP6$^{O/E}$ linie již obsahuje tři kazety se selekčními markery, byla použita linie divokého typu Lister 427. V době psaní této práce se mi podařilo úspěšně odstranit jednu z alel podjednotky NUBM (Obr. 23). Práce na této linii bude pokračovat a po vytvoření double knock-outu bude následně do této linie vložen konstrukt pro zvýšenou RBP6 expresi, která umožňuje indukci diferenciace a studium role komplexu I v rámci diferenciace hmyzích stádií.

Další překážkou, se kterou jsem se při své práci potýkala, bylo selhání metody RNAi použitím vektoru pTrypson (McAllaster et al., 2016). Přestože tímto přístupem se povedlo eliminovat podjednotku NDUFA6, v případě podjednotky NUBM se umlčení genu nezdařilo.

Běžnou záležitostí, kdy RNAi přestane fungovat, bývá v případech, kdy je RNAi cílena na esenciální gen. Pak dochází k selekci rezistentních buněk bez funkční RNAi, protože probíhající RNAi je pro buňky fatální. Nicméně cílem RNAi v našem případě esenciální gen nebyl. Další možností, která by mohla způsobit nefunkčnost RNAi systému, jsou mutace ovlivňující regulaci a funkčnost T7 RNA polymerázy anebo tetracyklinového represoru. Tyto mutace se dělí na trans-acting a cis-acting. Trans-acting mutace jsou mutace ovlivňující genovou expresi regulačních faktorů (v našem případě T7 RNA polymerázy a tetracyklinového receptoru). Cis-acting mutace způsobují narušení aktivace transkripčního procesu, kdy se regulační faktor exprimuje, ale není schopen své regulační funkce, tj. se vyvázat z genu, jež reguluje anebo naopak na gen nasednout. Pro ověření, že cis-acting oblasti pro nasednutí T7 RNA polymerázy a tetracyklinový receptor neobsahují nějaké mutace, byl použitý vektor pTrypson osekvenován použitím Sangerovy analýzy. Žádné mutace detekovány nebyly. Pomocí western blotu jsme pak také ověřovali, zda nedošlo ke snížení či eliminaci exprese regulačních proteinů T7 RNA polymerázy a tetracyklinového represoru (Obr. 24). Přítomnost těchto faktorů však byla potvrzena. Pro detailnější analýzu cis-acting a trans-acting mutací v rámci nefungující buněčné linie by byla třeba důkladnější sekvenční analýza lokusu, do které byl pTrypson integrován a části genomu, kde jsou integrovány geny pro T7 RNA polymerázu a tetracyklinový receptor.

Význam komplexu I v *T. brucei* je enigmatickou otázkou. V procyklickém ani krevním stádiu signifikantně nepřispívá k oxidaci NADH ani tvorbě membránového potenciálu, i když klíčové podjednotky pro tyto aktivity jsou v genomu přítomny a komplex I je v těchto stádiích sbalen (Surve et al., 2012; Verner et al., 2011). Mitochondriálně kódované podjednotky komplexu I jsou transkribovány a mRNA je následně podrobována energeticky náročnému RNA editingu (Souza et al., 1992; Surve et al., 2012). Zároveň jiné organismy taktéž vlastnící alternativní dehydrogenázu NDH2, jako kvasinky, *Plasmodium* anebo *Toxoplasma,* nepodstupují energeticky nákladný proces transkripce, translace a skládání komplexu I a došlo u nich ke ztrátě komplexu I (Büschges et al., 1994; Saleh et al., 2007). Naproti tomu *T. brucei* investuje energii pro tvorbu komplexu I v procyklickém i krevním stádiu a je tedy vysoce pravděpodobné, že přítomnost komplexu I má pro *T. brucei* důležitou roli.

Očekávaným vysvětlením je potřeba aktivity komplexu I v jiných, méně prostudovaných stádiích *T. brucei*. Jako první z možností se nabízí krátká zavalitá krevní forma, u níž byla pozorována vysoká oxidace NADH a zároveň membránový potenciál citlivý na rotenon, což by mohlo naznačovat účast aktivity komplexu I (Bienen et al., 1991;

Vickerman, 1985). Nicméně později bylo zjištěno, že membránový potenciál nesouvisí s oxidací NADH, ale je vytvářen hydrolýzou ATP komplexem F_oF_1-ATP syntázou (Dewar et al., 2018). Potenciálně by tedy komplex I mohl hrát roli ve stádiích, která se nacházejí v hmyzím přenašeči, mouše tse-tse. V mouše dochází k diferenciaci procyklické formy na epimastigoty a metacykliky. U epimastigotů diferencujících se *in vitro* pomocí $RBP6^{O/E}$ systému byla sledována vyšší aktivita NADH produkujících metabolických procesů a vyšší membránový potenciál. To by mohlo být způsobeno vyšší aktivitou komplexu I, který tak kompenzuje snížení expresních hladin komplexů III a IV, jež udržují membránový potenciál v procyklicích (Doleželová et al., 2020; Horváth et al., 2005). Pro pokračování výzkumu touto cestou je však esenciální připravit linie buněk, které nebudou obsahovat komplex I a zároveň v nich bude možné spustit indukci diferenciace *in vitro*.

6. Závěr

Tato práce významně přispívá ke studiu komplexu I a jeho role v diferenciaci *T. brucei* vytvořením potřebných buněčných linií. I přes spousty dílčích technických problémů se mi podařilo vytvořit linii s fungující RNAi podjednotky NUBM a to linii 29 - 13_NUBM^{V5tag}_NUBM^{p2T7177}, která bude sloužit jako základní buněčná linie pro studium role komplexu I v procyklických buňkách trypanozom. Také byla vytvořena buněčná linie, která postrádá jednu alelu podjednotky NUBM, a tato linie bude využita k dalším genetickým úpravám tak, aby vznikl finální nástroj, který nám umožní studium role komplexu I v rámci diferenciace hmyzích forem *T. brucei*. Zároveň byly otestovány různé přístupy sloužící k umlčení genů a jejich vhodnost k použití v tomto projektu. Bylo rovněž ověřeno, že sledování aktivity komplexu I pomocí barvení v nativním gelu není dostatečně specifickou metodou a že její použití pro detekci komplexu I vyžaduje další optimalizaci.

7. Reference

Acestor, N., Zíková, A., Dalley, R. A., Anupama, A., Panigrahi, A. K., & Stuart, K. D. (2011). Trypanosoma brucei mitochondrial respiratome: Composition and organization in procyclic form. *Molecular and Cellular Proteomics*, *10*(9), 1–14. https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006908

Alsford, S., Turner, D. J., Obado, S. O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., … Horn, D. (2011). High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome research*, *21(6)*, 915–924. https://doi.org/10.1101/gr.115089.110.

Angerer, H., Radermacher, M., Mankowska, M., Steger, M., Zwicker, K., Heide, H., … Zickermann, V. (2014). The LYR protein subunit NB4M/NDUFA6 of mitochondrial complex i anchors an acyl carrier protein and is essential for catalytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(14), 5207–5212. https://doi.org/10.1073/pnas.1322438111

Bassett, A., & Liu, J. L. (2014). CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in Drosophila. *Methods*, *69*(2), 128–136. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.019

Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., & Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *Royal Society Open Science*, *4*(5), 1–16. https://doi.org/10.1098/rsos.170095

Bienen, E. J., Saric, M., Pollakis, G., Grady, R. W., & Clarkson, A. B. (1991). Mitochondrial development in Trypanosoma brucei brucei transitional bloodstream forms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *45*(2), 185–192. https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90085-K

Brandt, U. (2006). Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 69–92. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539

Büschges, R., Bahrenberg, G., Zimmermann, M., & Wolf, K. (1994). Nadh: Ubiquinone oxidoreductase in obligate aerobic yeasts. *Yeast*, *10*(4), 475–479. https://doi.org/10.1002/yea.320100406

Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P.

T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(20), 11715–11720. https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715

Chaudhuri, M., Ott, R. D., & Hill, G. C. (2006). Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*, *22*(10), 484–491. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.007

Chouchani, E. T., Pell, V. R., James, A. M., Work, L. M., Saeb-Parsy, K., Frezza, C., … Murphy, M. P. (2016). A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metabolism*, *23*(2), 254–263. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009

Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Rivière, L., Plazolles, N., … Bringaud, F. (2008). Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(24), 16343–16354. https://doi.org/10.1074/jbc.M709592200

Dewar, C. E., MacGregor, P., Cooper, S., Gould, M. K., Matthews, K. R., Savill, N. J., & Schnaufer, A. (2018). Mitochondrial DNA is critical for longevity and metabolism of transmission stage Trypanosoma brucei. *PLoS Pathogens*, *14*(7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007195

Doleželová, E., Kunzová, M., Dejung, M., Levin, M., Panicucci, B., Regnault, C., … Zíková, A. (2020). *Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of Trypanosoma brucei*. *PLoS Biology*, 18(6). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000741

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). https://doi.org/10.1126/science.1258096

Duarte, M., Ferreira, C., Khandpur, G. K., Flohr, T., Zimmermann, J., Castro, H., … Tomás, A. M. (2021). Leishmania type II dehydrogenase is essential for parasite viability irrespective of the presence of an active complex I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(42). https://doi.org/10.1073/pnas.2103803118

Duarte, M., & Tomás, A. M. (2014). The mitochondrial complex I of trypanosomatids - An overview of current knowledge. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *46*(4),

299–311. https://doi.org/10.1007/s10863-014-9556-x

Fang, J., & Beattie, D. S. (2002). Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic Trypanosoma brucei mitochondria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *123*(2), 135–142. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00139-1

Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A., & Jannin, J. G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, *6*(1), 257–275. https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, *6*(5), 343–345. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(9), 505–513. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002

Hernandez, F. R., & Turrens, J. F. (1998). Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of Trypanosoma brucei and T. cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *93*(1), 135–137. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00015-2

Horváth, A., Horáková, E., Dunajčíková, P., Verner, Z., Pravdová, E., Šlapetová, I., … Lukeš, J. (2005). Downregulation of the nuclear-encoded subunits of the complexes III and IV disrupts their respective complexes but not complex I in procyclic Trypanosoma brucei. *Molecular Microbiology*, *58*(1), 116–130. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04813.x

Kerscher, S. J. (2000). Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1459*(2–3), 274–283. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00162-6

Kolev, N. G., Ramey-Butler, K., Cross, G. A. M., Ullu, E., & Tschudi, C. (2012). Developmental progression to infectivity in Trypanosoma brucei triggered by an RNA-binding protein. *Science*, *338*(6112), 1352–1353. https://doi.org/10.1126/science.1229641

Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7607–7612. https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103

LaCount, D. J., Bruse, S., Hill, K. L., & Donelson, J. E. (2000). Double-stranded RNA interference in Trypanosoma brucei using head-to-head promoters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *111*(1), 67–76. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00300-5

MacGregor, P., & Matthews, K. R. (2010). New discoveries in the transmission biology of sleeping sickness parasites: Applying the basics. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(9), 865–871. https://doi.org/10.1007/s00109-010-0637-y

Mantilla, B. S., Marchese, L., Casas-Sánchez, A., Dyer, N. A., Ejeh, N., Biran, M., … Silber, A. M. (2017). Proline Metabolism is Essential for Trypanosoma brucei brucei Survival in the Tsetse Vector. *PLoS Pathogens*, *13*(1), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006158

McAllaster, M. R., Sinclair-Davis, A. N., Hilton, N. A., & de Graffenried, C. L. (2016). A unified approach towards Trypanosoma brucei functional genomics using Gibson assembly. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *210*(1–2), 13–21. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.08.001

Mitchell, P., & Moyle, J. (1967). Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation. *Nature Publishing Group*, *216*, 615–616.

Mittra, B., Cortez, M., Haydock, A., Ramasamy, G., Myler, P. J., & Andrews, N. W. (2013). Iron uptake controls the generation of leishmania infective forms through regulation of ROS levels. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(2), 401–416. https://doi.org/10.1084/jem.20121368

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13. https://doi.org/10.1042/BJ20081386

Opperdoes, F. R., & Michels, P. A. M. (2008). Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends in Parasitology*, *24*(7), 310–317. https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.013

Ponti, V., Dianzani, M. U., Cheeseman, K., & Slater, T. F. (1978). Studies on the reduction of

nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chemico-Biological Interactions*, *23*(3), 281–291. https://doi.org/10.1016/0009-2797(78)90090-X

Pryde, K. R., & Hirst, J. (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: A single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 18056–18065. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186841

Robb, E. L., Hall, A. R., Prime, T. A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., … Murphy, M. P. (2018). Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(25), 9869–9879. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003647

Roldán, A., Comini, M. A., Crispo, M., & Krauth-Siegel, R. L. (2011). Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic Trypanosoma brucei. *Molecular Microbiology*, *81*(3), 623–639. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07721.x

Saleh, A., Friesen, J., Baumeister, S., Gross, U., & Bohne, W. (2007). Growth inhibition of Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(4), 1217–1222. https://doi.org/10.1128/AAC.00895-06

Shaw, S., Shaw, S., Shaw, S., Knüsel, S., Hoenner, S., & Roditi, I. (2020). A transient CRISPR/Cas9 expression system for genome editing in Trypanosoma brucei. *BMC Research Notes*, *13*(1), 4–9. https://doi.org/10.1186/s13104-020-05089-z

Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P., & Figueiredo, L. M. (2017). Metabolic reprogramming during the Trypanosoma brucei life cycle. *F1000Research*, *6*, 683. https://doi.org/10.12688/f1000research.10342.1

Souza, A. E., Myler, P. J., & Stuart, K. (1992). Maxicircle CR1 transcripts of Trypanosoma brucei are edited and developmentally regulated and encode a putative iron-sulfur protein homologous to an NADH dehydrogenase subunit. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(5), 2100–2107. https://doi.org/10.1128/mcb.12.5.2100

Surve, S., Heestand, M., Panicucci, B., Schnaufer, A., & Parsons, M. (2012). Enigmatic

presence of mitochondrial complex I in Trypanosoma brucei bloodstream forms. *Eukaryotic Cell*, *11*(2), 183–193. https://doi.org/10.1128/EC.05282-11

Surve, S. V, Jensen, B. C., Heestand, M., Mazet, M., Smith, T. K., Bringaud, F., … Schnaufer, A. (2016). NADH dehydrogenase of Trypanosoma brucei is important for efficient acetate production in bloodstream forms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57-61. https://doi.org/ 10.1016/j.molbiopara.2016.10.001.

Verner, Z., Čermáková, P., Škodová, I., Kováčová, B., Lukeš, J., & Horváth, A. (2014). Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in Leishmania tarentolae, Crithidia fasciculata, Phytomonas serpens and procyclic stage of Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *193*(1), 55–65. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.02.003

Verner, Z., Čermáková, P., Škodová, I., Kriegová, E., Horváth, A., & Lukeš, J. (2011). Complex i (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is active in but non-essential for procyclic Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *175*(2), 196–200. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.003

Verner, Z., Škodová, I., Poláková, S., Ďurišová-Benkovičová, V., Horváth, A., & Lukeš, J. (2013). Alternative NADH dehydrogenase (NDH2): Intermembrane-space-facing counterpart of mitochondrial complex i in the procyclic Trypanosoma brucei. *Parasitology*, *140*(3), 328–337. https://doi.org/10.1017/S003118201200162X

Vickerman, K. (1965). Polymorphism and Mitochondrial Activity In Sleeping Sickness Trypanosomes. *Nature Publishing Group*, *208*(5007), 762–766.

Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin*, *41*(2), 105–114. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072036

Wickstead, B., Ersfeld, K., & Gull, K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *125*(1–2), 211–216. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00238-4

Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & Cross, G. A. M. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *99*(1), 89–101. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00002-X