

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Efekt overexprese mitochondriální alternativní oxidázy
v buňkách *Trypanosoma brucei***

Bakalářská práce

Lucie Rybová

Školitelka: RNDr. Alena Panicucci Zíková, Ph. D.

Konzultantka: Mgr. Eva Doleželová, Ph. D.

České Budějovice 2023

Rybová, L., 2023, Efekt nadprodukce mitochondriální alternativní oxidázy v buňkách *Trypanosoma brucei* (Effect of mitochondrial alternative oxidase overexpression in *Trypanosoma brucei* cells, Bc. Thesis in Czech) – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

In this bachelor thesis, the effects of overexpression of the alternative oxidase (AOX) in *Trypanosoma brucei*, a digenetic unicellular parasite, were investigated. AOX functions similarly to the respiratory complex IV, by transferring electrons to oxygen, but without contributing to the mitochondrial membrane potential, which affects the bioenergetic properties of mitochondria. This study focuses on the effects of overexpression of AOX in the procyclic form of *T. brucei* to detect changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species levels.

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2023

.....

Lucie Rybová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí Aleně Zíkové za vedení mé práce a ochotu mi cokoliv vysvětlit. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Evě Doleželové za ukázání potřebných technik, trpělivost a ochotu mi vše vysvětlit. Poděkování dále patří celému AZ lab týmu za vytvoření příjemného přátelského kolektivu a ochotu se vším poradit. Také bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a příteli za veškerou podporu během psaní této práce.

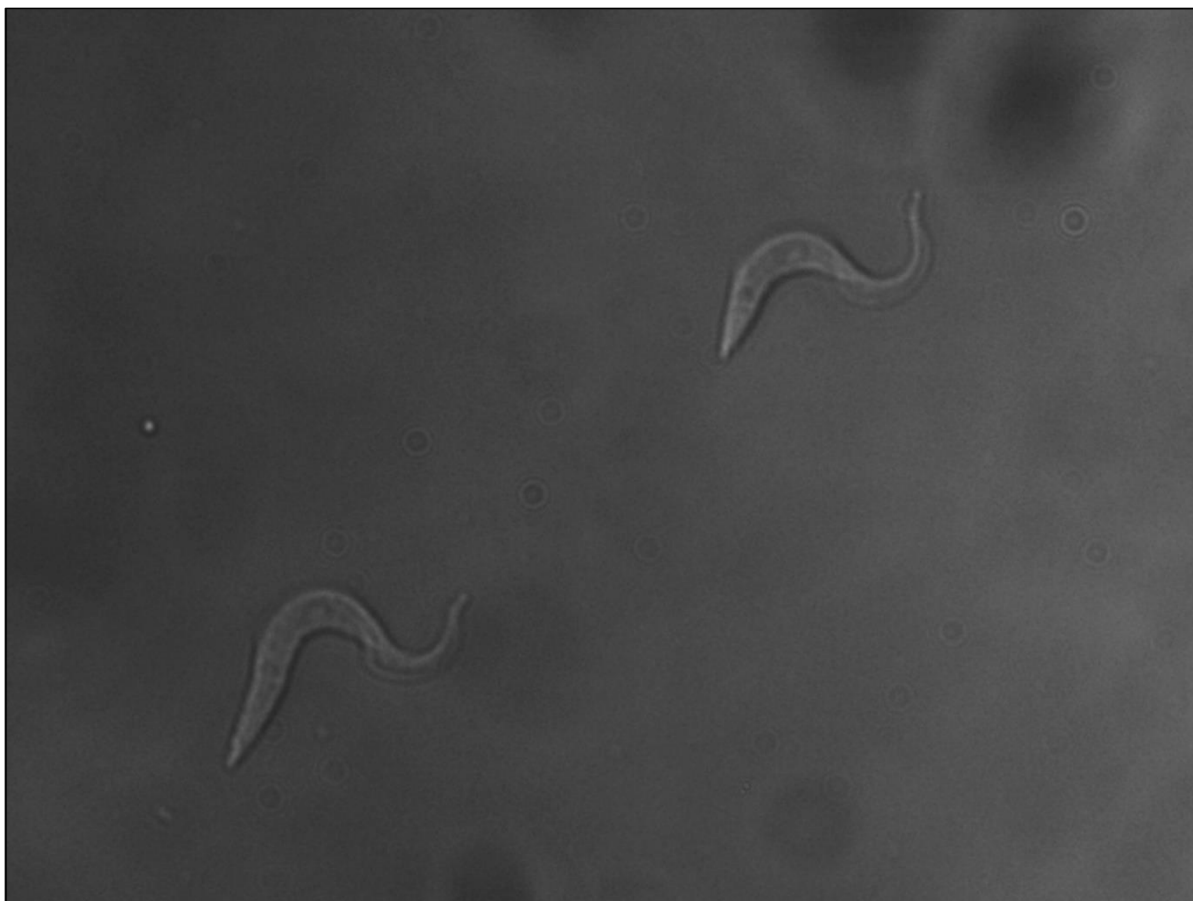
Obsah

1	Úvod	1
1.1	Životní cyklus <i>T. brucei</i>	2
1.2	Vliv rozdílnosti prostředí na metabolismus parazita	3
1.2.1	Metabolismus procyklické formy	4
1.2.2	Metabolismus krevní formy	4
1.3	Mitochondriální membránový potenciál	7
1.4	Volné radikály kyslíku – ROS	9
1.5	Regulace genové exprese alternativní oxidázy u <i>T. brucei</i>	11
2	Cíle práce.....	12
3	Materiály a metody	13
3.1	Linie 29-13.....	13
3.2	Kultivace a měření buněk trypanozóm	13
3.3	Spuštění over-exprese alternativní oxidázy	13
3.3.1	Příprava plazmidové DNA nesoucí gen pro alternativní oxidázu	13
3.3.2	Spuštění over-exprese alternativní oxidázy	17
3.4	Ověření over-exprese alternativní oxidázy	17
3.4.1	Western blot analýza	17
3.4.2	Digitoninová subcelulární frakcionace.....	19
3.4.3	IFA.....	21
3.5	Mapování buněčného dýchání po indukci alternativní oxidázy	22
3.5.1	Měření respirace	22
3.6	Vliv over-exprese alternativní oxidázy na růst buněk	22
3.6.1	Růstová křivka.....	22
3.7	Vliv over-exprese alternativní oxidázy na základní funkce mitochondrie	23
3.7.1	Měření membránového potenciálu	23
3.7.2	Měření mitochondriálních radikálů kyslíku	24

3.7.3	Měření celulárních radikálů kyslíku	25
4	Výsledky	27
4.1	Ověření over-exprese AOX	27
4.1.1	Ověření over-exprese v buněčných lyzátech metodou western blot	27
4.1.2	Ověření over-exprese alternativní oxidázy ve správné části buňky	32
4.1.3	Ověření mitochondriální lokalizace over-exprimované AOX metodou immunofluorescence.....	33
4.2	Zjištění vlivu over-exprese AOX na růst buněk	35
4.3	Mapování buněčného dýchání po indukci AOX.....	38
4.4	Ověření vlivu over-exprese AOX na základní funkce mitochondrie.....	40
4.4.1	Mitochondriální membránový potenciál	41
4.4.2	Měření hladiny radikálů kyslíku.....	42
5	Diskuze	46
5.1	Změna růstu buněčných linií po indukci AOX.....	46
5.2	Změna mitochondriálního membránového potenciálu po indukci AOX.....	47
5.3	Změna buněčného dýchání po indukci AOX.....	48
6	Závěr	49
7	Seznam použité literatury	50

1 Úvod

Trypanosoma brucei je parazitický prvek způsobující trypanozomiázu, známou také jako spavou nemoc u lidí a nagana u dobytka (Q. Zhou et al., 2014). Parazit se vyskytuje v subsaharské Africe, kde je mezi hostiteli rozšiřován pomocí hmyzího přenašeče mouchy tse-tse (G. Romero-Meza & M. R. Mugnier, 2020). Druh *Trypanosoma brucei* má celkem tři poddruhy, dva infekční pro člověka (*T. b. rhodesiense* a *T. b. gambiense*) a jeden napadající hospodářská zvířata (*T. b. brucei*) (Q. Zhou et al., 2014). V této práci byla studována hmyzí forma poddruhu *Trypanosoma b. brucei* (Obrázek 1). Tento poddruh sice přímo neovlivňuje člověka, ale v afrických zemích má negativní vliv na tamní hospodářství.



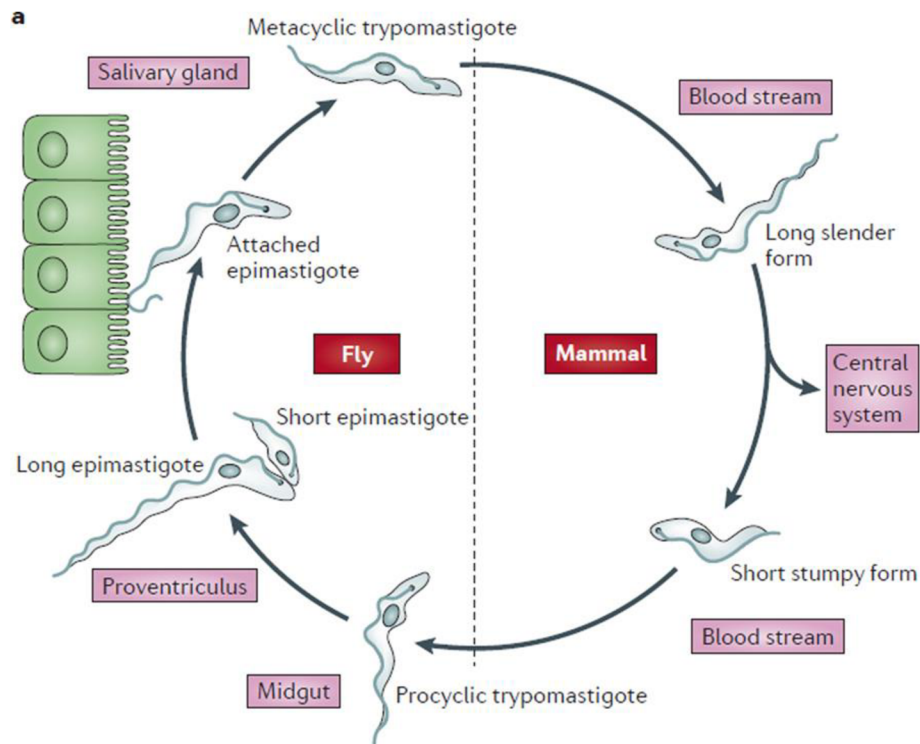
Obr. 1: Procyklická forma parazita *Trypanosoma brucei*. Snímek byl pořízen světelným mikroskopem při zvětšení 100×.

1.1 Životní cyklus *T. brucei*

Trypanosoma brucei má komplexní životní cyklus, který zahrnuje několik životních fází jak v hmyzím přenašeči (moucha tse-tse), tak v savčím hostiteli (dobytek nebo člověk) (Obrázek 2). Jelikož parazit během svého života obývá rozdílná prostředí, prochází řadou transformací, které mu v těchto prostředích umožňují přežít a zpracovávat odlišné zdroje potravy. V hmyzím přenašeči se parazit přizpůsobuje na život uvnitř trávicího traktu a ve slinných žlázách, zatímco v savčím hostiteli se transformuje, aby unikl imunitnímu systému hostitele a mohl přežít v jeho krevním řečišti a dalších tkáních.

Trypanosoma brucei se dovnitř hmyzího přenašeče dostane poté, co moucha tse-tse nasaje krev od infikovaného savce. Krevní trypomastigoti (kinetoplast mají posteriorně lokalizovaný za jádrem (C. P. Ooi & P. Bastin, 2013)) se dostávají do středního střeva, kde se diferencují na procyklické trypomastigoty ((glykoproteinový obal krevní formy je nahrazen procykliny) (G. Romero-Meza & M. R. Mugnier, 2020)) (G. Langousis & K. L. Hill., 2014). Během migrace do slinných žláz se procyklické trypomastigoty diferencují na epimastigoty (kinetoplast mají posteriorně lokalizovaný před jádrem (C. P. Ooi & P. Bastin, 2013)) s asymetrickým dělením, při kterém vzniká jeden krátký a jeden dlouhý epimastigot (G. Langousis & K. L. Hill., 2014). Krátkí epimastigoti se po vstupu do slinných žláz přichytí k epitelu (G. Langousis & K. L. Hill., 2014). Poté, co kolonie dosáhne dostatečně velké hustoty, se někteří epimastigoti oddělí od epitelu slinných žláz a diferencují se na metacyklické formy infekční pro savce (J. R. Seed & M. A. Wenck, 2003) (procykliny jsou nahrazeny glykoproteinovým obalem (G. Romero-Meza & M. R. Mugnier, 2020)).

Metacyklická forma parazita se dostává do kožní tkáně savčího hostitele po kousnutí infikovaným hmyzem. Parazit vstupuje do krevního a lymfatického oběhu, kde se diferencuje na dlouhou štíhlou formu (F. Achcar et al., 2014) (G. Langousis & K. L. Hill., 2014). Tato forma dokáže penetrovat endotelem cév a infikovat tak další tkáně, včetně centrálního nervového systému (G. Langousis & K. L. Hill., 2014). Po čase se dlouhá štíhlá forma diferencuje na krátkou kulatější formu, která je adaptovaná na přenos do hmyzího přenašeče (Y. Fukai et al., 1999). Krátká forma po kousnutí savce hmyzem tento hmyz infikuje.



Obr. 2: Životní cyklus endoparazita *Trypanosoma brucei*. Fly – životní cyklus uvnitř hmyzího přenašeče, Mammal – životní cyklus uvnitř savčího hostitele, long slender form – dlouhá štíhlá forma, short stumpy form – krátká kulatější forma. (G. Langousis & K. L. Hill., *Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei*, 2014).

1.2 Vliv rozdílnosti prostředí na metabolismus parazita

Metabolismus trypanozómy se v průběhu životního cyklu přizpůsobuje na odlišnou dostupnost živin. Procyklická forma se uvnitř hmyzího přenašeče živí především aminokyselinami, ze kterých získává energii ve formě ATP prostřednictvím Krebsova cyklu a respiračního řetězce spojeného jak se substrátovou, tak oxidativní fosforylací (N. Bochud-Allemann & A. Schneider, 2002). Zatímco krevní forma se v savčím hostiteli nachází v prostředí s vysokým obsahem glukózy, což ji umožňuje získávat energii hlavně na substrátové úrovni pomocí glykolýzy, přičemž pyruvát je vylučován z buňky jako odpadní produkt (M. Chaudhuri et al., 2006). Mezi procyklickou a krevní formou je markantní rozdíl v mitochondriálních membránových komplexech účastnících se energetického metabolismu. Podobně jako je tomu u ostatních aerobních eukaryot, mitochondrie procyklické formy obsahuje ATP syntázu a čtyři membránové respirační komplexy I, II, III a IV zapojené do oxidativní fosforylace. V mitochondrii procyklické formy je dále v nízkém množství zastoupena alternativní oxidáza, což je terminální oxidáza, která u savců zcela chybí (M. Chaudhuri et al., 2006). Po napadnutí savčího hostitele trypanozóma ztrácí respirační

komplexy závislé na cytochromu (komplex III a IV) a ty jsou funkčně nahrazeny alternativní oxidázou (T. Shiba et al., 2013).

1.2.1 Metabolismus procyklické formy

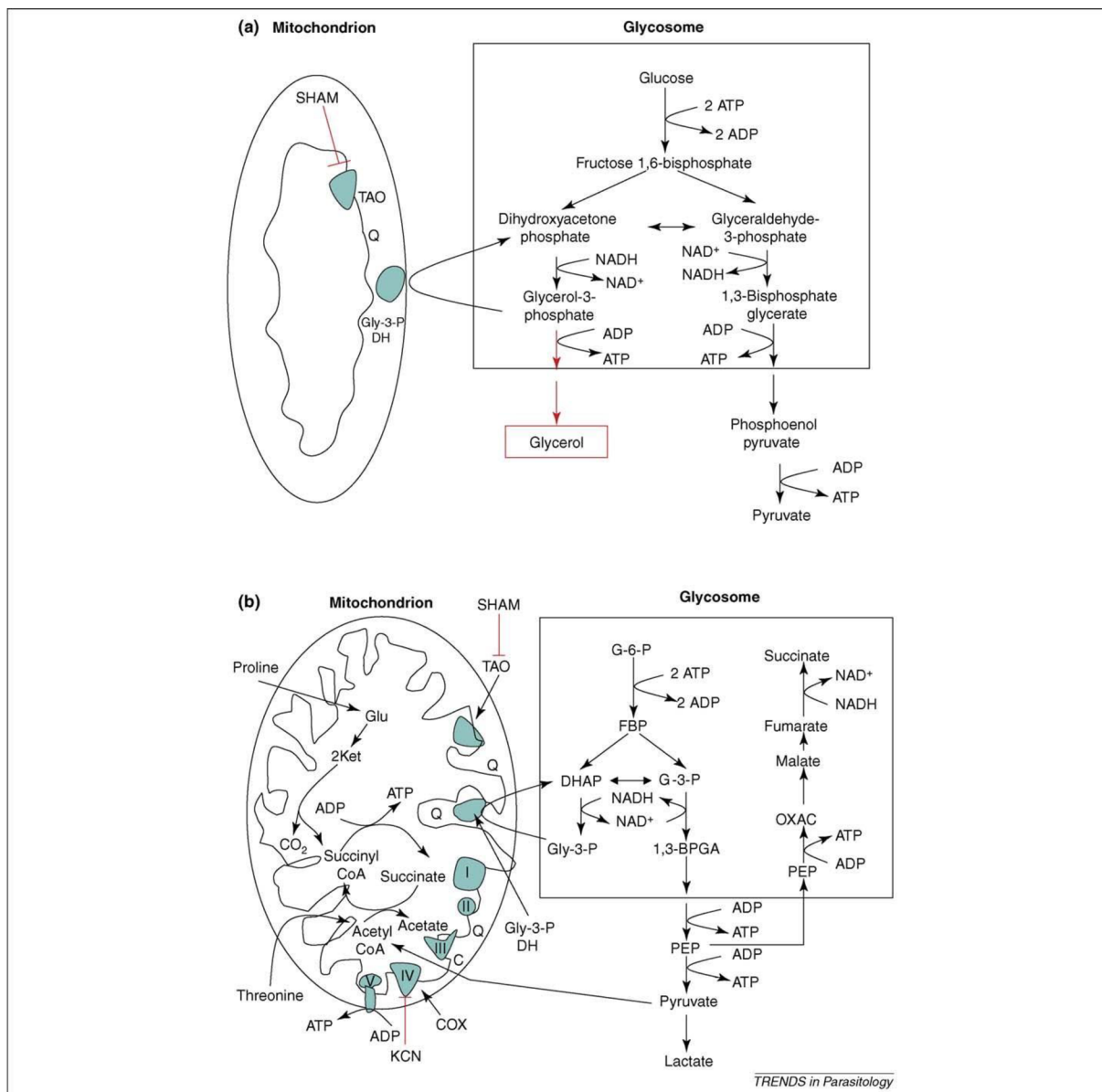
Procyklická forma se živí aminokyselinami (především prolinem), protože střední střevo mouchy tse-tse neobsahuje téměř žádnou glukózu, a naopak je bohaté právě na aminokyseliny (R. A. Balogun, 1974). Během katabolismu prolinu uvnitř mitochondrií dochází ke vzniku redukovaných kofaktorů a odpadních produktů alaninu a acetátu, který jsou vylučovány z buňky (T. K. Smith et al., 2017) (Obrázek 3). Redukované kofaktory jsou dále oxidované prostřednictvím dýchacího řetězce (Obrázek 4). Energie uvolněná během oxidace kofaktorů je využita k přenosu protonů do mezimembránového prostoru mitochondrie (Obrázek 4). Protože protony jsou přeneseny proti svému přirozenému gradientu a snaží se dostat zpět do mitochondriálního matrixu, ATP syntáza využívá tyto protony jako hybnou sílu ke tvorbě ATP z ADP a anorganického fosfátu.

Pokud je však procyklické formě poskytnuta glukóza, získává většinu energie prostřednictvím glykolýzy a oxidací pyruvátu na acetát v mitochondrii, která je spjata s produkcí ATP substrátovou fosforylací (T. K. Smith et al., 2017). Konečnými produkty metabolismu glukózy procyklických forem je hlavně acetát a sukcinát (T. K. Smith et al., 2017).

1.2.2 Metabolismus krevní formy

Krevní forma získává energii z glukózy pomocí glykolýzy. Během glykolýzy buňka z jedné molekuly glukózy získá dvě molekuly ATP, dva redukované kofaktory (NADH) a dvě molekuly pyruvátu (R. Chaudhry & M. Varacallo, 2022). Většina pyruvátu je z buňky vylučována jako odpadní produkt a přibližně 15 % je přeměňováno na acetát, alanin a sukcinát (M. Mazet et al., 2013). Aby mohla nadále probíhat glykolýza, je potřeba aby docházelo k oxidaci nahromaděného NADH. K tomu dochází prostřednictvím mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázy, která oxiduje glycerol-3-fosfát na dihydroxyacetát, který se vrací do glykolýzy. Elektrony z glykolytického NADH jsou přeneseny na ubiquinon za vzniku ubiquinolu, z něhož jsou následně pomocí alternativní oxidázy přeneseny na kyslík, který slouží jako konečný akceptor elektronů (M. Chaudhuri et al., 2006). Krevní forma *T. brucei* exprimuje pouze alternativní oxidázu jako terminální oxidázu. Při absenci proton-pumpujících komplexů III a IV je protonový gradient vytvářen ATP syntázou v obráceném směru, jenž

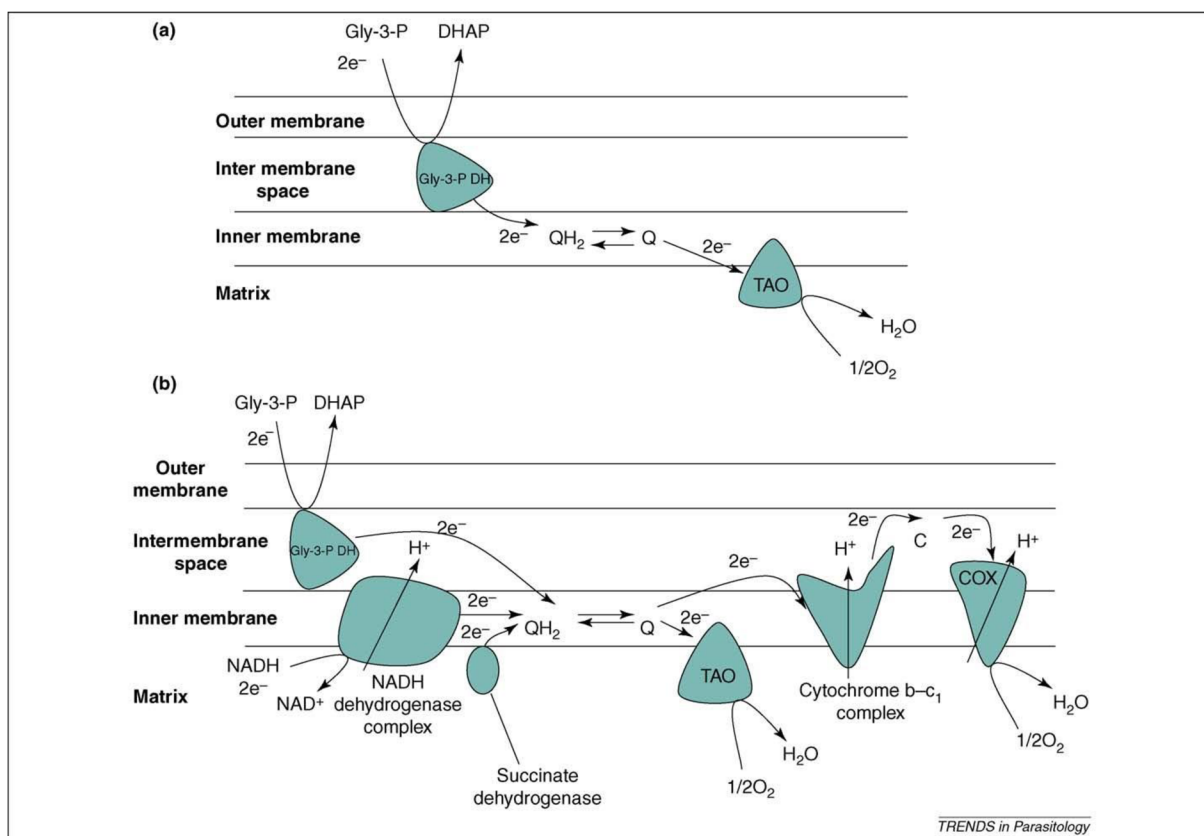
hydrolyzuje ATP na ADP a uvolněnou energii využívá k translokaci protonů do mezimembránového prostoru.



Obr. 3: Energetický metabolismus krevní a procyklické formy. (a) – metabolismus krevní formy *Trypanosoma brucei*, (b) – metabolismus procyklické formy *Trypanosoma brucei*, SHAM – inhibitor alternativní oxidázy (kyselina salicylo-hydroxamová), KCN – inhibitor komplexu IV (kyanid draselný), TAO – alternativní oxidáza (*Trypanosoma alternative oxidase*), I, II, III a IV – respirační komplexy, V – ATP syntéza, Q – koenzym Q (ubichinon), C – cytochrom C, Glu – glutamát, 2Ket – α-ketoglutarát, OXAC – oxalacetát, FBP – fruktóza 1,6-bisfosfát, 1,3-BPGA – 1,3-bisfosfoglycerát, G-6.P – glukóza-6-fosfát, Gly-3-P – glycerol-3-fosfát, Gly-3-P DH – glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, COX – cytochrom C oxidáza (komplex IV), PEP – fosfoenol pyruvát. (M. Chaudhuri et al., *Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function*, 2006).

1.2.2.1 Alternativní oxidáza

Alternativní oxidáza je jediná mitochondriální terminální oxidáza, která je přítomná u krevní formy (M. Chaudhuri et al., 2006). Protein alternativní oxidázy je v nízkém množství produkován i u procyklické formy, kde pravděpodobně slouží jako ochrana proti volným radikálům, jelikož inhibice alternativní oxidázy pomocí SHAM vede ke zvýšené produkci radikálů kyslíku (J. Fang & D. S. Beattie, 2003). Alternativní oxidáza se dále vyskytuje u hub, rostlin a některých řádů protistů (G. C. Vanlerberghe & L. McIntosh, 1997). Jelikož alternativní oxidáza je pro fungování krevních forem trypanozóm esenciální a u savců zcela chybí, představuje atraktivní cíl při léčbě trypanozomiázy (S. K. Menzies et al., 2016). Alternativní oxidáza se skládá ze čtyř α -šroubovic (α -helixů), které jsou přes aminokyselinové zbytky spojené se dvěma atomy železa (M. Chaudhuri et al., 2006). Protein slouží jako koncová oxidáza, která přenáší čtyři elektrony ze dvou molekul ubichinolu na jednu molekulu kyslíku za vzniku vody (M. Chaudhuri et al., 2006). Narozdíl od respiračních komplexů III a IV, alternativní oxidáza během přenosu elektronů nepřenáší protony, a proto nenapomáhá vzniku membránového potenciálu na mitochondriální membráně a tím syntéze ATP oxidativní fosforylací (A. B. Clarkson J. et al., 1989) (Obrázek 2). Jelikož alternativní oxidáza nevyužívá energii k přenosu protonů, tato energie se ztrácí ve formě tepla (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022).



Obr. 4: Elektronový transportní řetězec u krevní a procyklické formy parazita *Trypanosoma brucei*. (a) – mitochondriální elektronový systém závislý na alternativní oxidáze u krevní formy, (b) – mitochondriální elektronový systém spojený s přenosem protonů u procyklické formy, *Q* – koenzym *Q* (ubichinon), *QH₂* – ubichinol, TAO – alternativní oxidáza (*Trypanosoma alternative oxidase*), Gly-3-P – glycerol-3-fosfát, Gly-3-P DH – glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, DHAP – dihydroxyacetyl fosfát, C – cytochrom C, COX – cytochrom C oxidáza (komplex IV), (M. Chaudhuri et al., *Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function*, 2006).

1.3 Mitochondriální membránový potenciál

Mitochondriální membránový potenciál je vytvářen rozdílným pH a nábojem mezi mitochondriálním matrixem a mezimembránovým prostorem. Mezimembránový prostor má nižší pH a kladný náboj (jelikož je zde větší koncentrace protonů), zatímco mitochondriální matrix má vyšší pH a záporný náboj (jelikož je zde vyšší zastoupení elektronů). To je způsobeno tím, že vnitřní mitochondriální membrána je nepropustná pro většinu látek, přičemž protony jsou aktivně pumpovány do mezimembránového prostoru pomocí respiračního řetězce. Tento proces umožňuje vznik elektrochemického gradientu, který je v mitochondriích esenciální pro import proteinů dovnitř mitochondrie, udržení iontové homeostázy a tvorbu ATP (B. Alberts et al., 2002).

Je potřeba, aby mitochondriální proteiny, které jsou syntetizované v cytozolu, byly transportovány dovnitř mitochondrií. K importu protonů dovnitř mitochondrie dochází díky komplexům TOM (přenáší proteiny přes vnější mitochondriální membránu) a TIM (přenáší proteiny přes vnitřní mitochondriální membránu), tyto komplexy využívají elektrochemický gradient a energii uvolněnou během hydrolýzy ATP (Bauer M. F. et al., 2000).

Iontová homeostáza je důležitá pro normální fungování buňky. Koncentrace iontu v mitochondriálním matrixu a mezimembránovém prostoru je regulována pomocí specifických kanálů, jelikož vnitřní membrána je pro většinu iontů nepropustná. Koncentrace vodíkových iontů je regulována pomocí komplexů dýchacího řetězce. Gradient vodíkových iontů je využíván ke tvorbě ATP.

ATP vzniká díky činnosti ATP syntázy, která je poháněna protonovou hnací silou. ATP syntáza využívá toho, že se protony přirozeně snaží dostat do mitochondriálního matrixu. Pohyb protonů tak pohání rotaci motoru ATP syntázy, která svou rotací po směru hodinových ručiček způsobuje konformační změnu v F_1 podjednotce. Tyto konformační změny způsobují reakci ADP spolu s anorganickým fosfátem za vzniku ATP (J. E. Walker, 2013).

Mitochondriální membránový potenciál vzniká díky činnosti dýchacího řetězce, během kterého dochází k transportu protonů do mezimembránového prostoru a tím vytvoření protonového gradientu. Na transportu protonů do mezimembránového systému se podílí komplexy I, III a IV. Tyto komplexy využívají k přenosu energie z oxidace elektronových přenašečů (NADH, ubichinol a cytochrom c).

NADH, který vzniká během Krebsova cyklu, je oxidován komplexem I na NAD^+ . Komplex I přenáší elektrony na ubichinon a zároveň energii uvolněnou z oxidace využívá k přenosu protonů do mezimembránového prostoru. Komplex II redukuje FAD na $FADH_2$ pomocí elektronů z oxidace sukcinátu, následně tyto elektrony přenáší na ubichinon. Na rozdíl od komplexů I a III, oxidace na komplexu II není spojená s přímým přenosem protonů. Komplex III využívá energii, uvolněnou během oxidace ubichinolu z komplexů I a II, k transportu protonů. Elektrony z ubichinolu jsou přeneseny na cytochrom c, který je přenáší ke komplexu IV, kde je pomocí nich redukován kyslík (konečný akceptor elektronů) na vodu, přičemž zároveň dochází k přenosu protonů.

Množství přenesených protonů je mezi jednotlivými respiračními komplexy rozdílné. Komplex I přenáší čtyři protony za každé dva elektrony (D. Nolfi-Donagan, 2020). Komplex II nepřenáší protony, ale pouze elektrony na ubichinon, který napomáhá

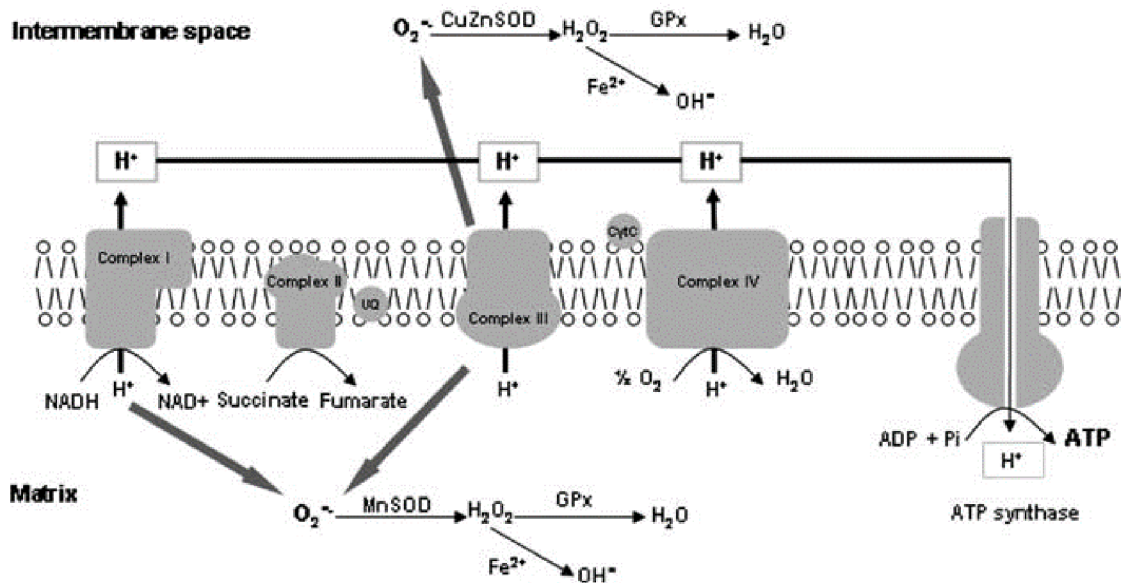
protonovému přenosu na komplexu III (D. Nolfi-Donagan, 2020). Komplex III přenáší čtyři protony za každé dva elektrony a komplex IV přenáší čtyři protony (dva jsou ale spotřebovány na redukci kyslíku na vodu) za každé čtyři elektrony (D. Nolfi-Donagan, 2020).

Alternativní oxidáza nepřenáší protony z mitochondriálního matrixu do mezimembránového prostoru, a proto nepřispívá k tvorbě membránového potenciálu (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022). Zároveň její přítomnost může snižovat hladinu membránového potenciálu, a tudíž množství vyprodukovaného ATP, jelikož odvádí elektrony od proton-pumpujících komplexů III a IV (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022).

1.4 Volné radikály kyslíku – ROS

Volné radikály kyslíku jsou vysoce reaktivní molekuly, které mimo jiné vznikají uvnitř mitochondrií během procesu oxidativní fosforylace. Dříve byly radikály kyslíku považovány za zdraví škodlivé (přispívající k chorobám a stárnutí), nicméně nové důkazy naznačují, že nízké hladiny radikálů kyslíku jsou důležité pro normální fungování buněk, jelikož se podílejí na buněčné signalizaci (F. Scialò et al., 2017). Ovšem při vysokých hladinách mohou působit jako toxické látky poškozující lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny (J. Yun & T. Finkel, 2014).

Volné radikály kyslíku vznikají poté, co molekula kyslíku přijme volný elektron, který unikl z dýchacího řetězce, k čemuž dochází za normálních podmínek v nízké míře. Nejčastějším místem úniku elektronů bývají respirační komplexy I a III (Chouchani et al., 2014). Z komplexu I unikají elektrony zpět do mitochondriálního matrixu z místa, kde dochází k oxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$, anebo z místa, kde se váže ubichinol během tzv. reverzního elektronového transportu (RET) (F. Scialò et al., 2017). Z komplexu III unikají elektrony do mitochondriálního matrixu nebo mezimembránového prostoru (F. Scialò et al., 2017). K RET dochází jen za určitých podmínek (vysoký poměr ubichinolu/ubichinonu, vysoká hladina membránového potenciálu, anoxie/hypoxie) a elektrony se vrací z redukovaného ubichinolu na NAD^+ (F. Scialò et al., 2017). Pokud dojde k nadměrné redukci ubichinonu díky např. zvýšené aktivitě komplexu II, či dysfunkci komplexů III a IV, zvyšuje se redukce NAD na komplexu I, což vede k předčasné redukci kyslíku na superoxid (F. Scialò et al., 2017). Vzniklý superoxid je velice rychle přeměněn pomocí molekuly vody a enzymatické aktivity superoxid dismutáz na peroxid vodíku, který je schopný procházet mitochondriální membránou.



Obr. 5: Produkce radikálů kyslíku respiračními komplexy. $O_2^{\cdot-}$ - superoxid, H_2O_2 – peroxid vodík, UQ – koenzym Q (ubichinon), CytC – cytochrom c, GPx – glutathion peroxidáza, enzym katalyzující redukci peroxidu vodíku, jedná se obranný systém organismus proti volným radikálům. (P. A. Figueiredo et al., *The role of mitochondria in aging of skeletal muscle*, 2008).

Jelikož alternativní oxidáza přijímá přímo elektrony ze dvou ubichinolů a redukuje pomocí nich kyslík, snižuje tak množství redukováného ubichinolu a pomáhá tak snižovat potenciální RET aktivitu komplexu I, a tudíž i množství radikálů kyslíku. Alternativní oxidáza může nahradit nefunkční komplexy III a IV, čímž také snižuje množství vyprodukovaných radikálů kyslíku komplexem III (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022). Zároveň však alternativní oxidáza snižuje i transport protonů a tím množství vyprodukovaného ATP (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022). Během stresových podmínek je pro buňku výhodnější metabolismus pomocí alternativní oxidázy, jelikož snižuje produkci radikálů kyslíku a biosyntéza proteinu je mnohem jednodušší než u respiračních komplexů (H. T. Jacobs & J. W. O. Ballard, 2022).

1.5 Regulace genové exprese alternativní oxidázy u *T. brucei*

Studium alternativní oxidázy v buňkách trypanozómy má potenciál přinést cenné poznatky, které by mohly přispět k vývoji účinnějších chemoterapeutik proti trypanozomiáze. Tento protein, který u savců zcela chybí, je pro přežití parazita v savčím hostiteli nezbytný, a proto představuje zajímavý chemoterapeutický cíl. Zároveň představuje trypanozóma výhodný modelový organismus pro výzkum mitochondrie, metabolismu a buněčné diferenciaci díky své jednoduchosti a schopnosti procházet buněčnou diferenciací in vitro.

Genová exprese AOX je regulována během životního cyklu parazita. Tento enzym je upregulován v krevní formě parazita a představuje jedinou a nezbytnou terminální oxidázu buňky. Oproti tomu se tento enzym vyskytuje v nízké míře u procyklické formy nacházející se ve střevě mouchy tse-tse, ale jeho exprese je výrazně zvýšená u epimastigotů, formy nacházející se ve slinných žlázách (A. Naguleswaran et al., 2021). V laboratoři bylo ukázáno, že exprese AOX je zvýšená také během in vitro diferenciaci procyklické formy do epimastigotů a metacykliků. Tato in vitro diferenciaci trypanozóm je spuštěna indukci exprese RNA vazebného proteinu 6 (RBP6) (A. Naguleswaran et al., 2021). Jelikož několikanásobně zvýšená exprese AOX je jedním z prvních charakteristických znaků in vitro diferenciaci, rozhodli jsme se popsat změny v několika základních mitochondriálních parametrech po indukci AOX pouze v procyklických buňkách *T. brucei*, které neprocházejí RBP6-indukovanou diferenciací. Následné porovnání obou linií může pomoci v pochopení metabolických změn, které doprovázejí buněčnou diferenciaci trypanozóm (E. Doleželová et al., 2020).

2 Cíle práce

1. Ověřit indukovanou over-expresi alternativní oxidázy v buněčných liniích *Trypanosoma brucei*
2. Zjistit, zda over-exprese alternativní oxidázy má vliv na růst buněk
3. Zmapovat buněčné dýchání po indukci alternativní oxidázy
4. Zjistit efekt over-exprese alternativní oxidázy na základní funkce mitochondrie (např. membránový potenciál, ATP produkce, NADH/NAD poměr, produkce superoxidu)

3 Materiály a metody

3.1 Linie 29-13

V této práci byla použita linie procyklického stádia *T. brucei* 29-13. Tato linie exprimuje tetracyklinový represor a T7 RNA polymerázu pod selekčními markery neomycinem a hygromycinem (E. Wirtz et al., 1999). Linie 29-13 tedy obsahuje expresní systém sloužící k podmíněné indukci jakéhokoliv genu.

3.2 Kultivace a měření buněk trypanozóm

Buňky *T. brucei* byly kultivovány v základním médiu SDM 79 s 10 % fetálním hovězím sérem (Fetal bovine serum, FBS), anebo v médiu SDM 80, které neobsahuje glukózu.

Měření buněk

Koncentrace buněk byla zjišťována pomocí Z2 Coulter Counter (Beckman Coulter Inc.). 100 μ l buněk bylo smícháno se 100 μ l fixačního roztoku (150mM chlorid sodný a 15mM citronan sodný (SSC) a 3,6% formaldehyd). 50 μ l směsi bylo smícháno s 5-ti ml Hemosolu v kyvetě, která byla vložena do přístroje. Vyhodnocená koncentrace buněk byla zaznamenána a buňky byly vždy naředěny na koncentraci $2-5 \times 10^6$ buněk/ml.

3.3 Spuštění over-exprese alternativní oxidázy

3.3.1 Příprava plazmidové DNA nesoucí gen pro alternativní oxidázu

3.3.1.1 Izolace plazmidové DNA

Princip

Izolace plazmidové DNA je založena na principu alkalického zvratu. Metoda využívá rozdílných renaturačních vlastností genomové a plazmidové DNA (převzato z materiálů ke kurzu KMB/608, Mgr. Adam Bajgar, Ph. D.). Zvýšením pH pomocí NaOH dochází k rozrušení vodíkových vazeb mezi řetězci DNA. Po neutralizaci se obnoví původní struktura pouze u plazmidové DNA, jelikož její řetězce během lyze zůstávají fyzicky spojené ve formě super-šroubovice, zatímco genomová DNA je během lyze fragmentována (převzato z materiálů ke kurzu KMB/608, Mgr. Adam Bajgar, Ph. D.). Po centrifugaci pelet obsahuje

RNA, proteiny a genomovou DNA, zatímco supernatant obsahuje plazmidovou DNA. Plazmidová DNA je poté navázána na částice silika membrány a pomocí pufru vyčištěna.

Postup

Pomocí špičky byla sklizena kolonie *E. coli*. Špička s nabranou kolonií byla přemístěna do zkušavky s tekutým LB médiem (1% trypton, 0.5% kvasný extrakt, 1% NaCl) a ampicilinem (1:1000). Kolonie byla ponechána na třepačce (Lab Companion) při 37 °C do druhého dne. Druhý den byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí miniprep kitu (GenElute™ Plasmid Miniprep kit, Sigma-Aldrich). Buňky byly přemístěny do mikrozkušavky a stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 1 minuty. Bylo odebráno médium a k buňkám bylo přidáno 200 µl resuspendačního roztoku. Bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru, směs byla lehce promíchána. Lyzační reakce probíhala 4 minuty. Bylo přidáno 350 µl neutralizačního pufru. Vzorky byly stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 10 minut. 500 µl supernatantu bylo přelito na kolonku. Vzorky byly stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 1 minuty. Filtrát byl vyhozen a na kolonku bylo napipetováno 500 µl promývacího pufru 1. Vzorky byly stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 1 minuty. Filtrát byl vyhozen a na kolonku bylo napipetováno 750 µl promývacího pufru 2. Vzorky byly stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 1 minuty. Filtrát byl vyhozen a vzorky byly vysušeny stočením při 12000 x g, 25 °C po dobu 3 minut. Kolonka byla přemístěna do nové mikrozkušavky. Na kolonku bylo napipetováno 50 µl elučního pufru. Vzorky byly stočeny při 12000 x g, 25 °C po dobu 1 minuty. Čistota a koncentrace plazmidové DNA byla ověřena pomocí Nanodropu (Nanodrop 1000 – spektrofotometr).

3.3.1.2 Restrikční štěpení

Princip

Pro linearizaci plazmidů se používají restrikční enzymy, což jsou endonukleázy, které rozpoznávají specifické palindromy a ty následně štěpí hydrolýzou fosfodiesterové vazby. Restrikční enzymy původem pocházejí z bakterií, které je používají jako ochranu proti virovým napadením. V této práci byl použit restrikční enzym NOTI, který rozpoznává palindrom o 8 párech bází (Obrázek 6).



Obr. 6: Místo štěpení restrikčního enzymu NotI (převzato ze stránky New England Biolabs).

Postup

Koncentrace plazmidové DNA byla změřena pomocí Nanodropu (Nanodrop 1000 – spektrofotometr). Bylo smícháno 91 μl plazmidové DNA (30 μg), 4 μl restrikčního enzymu NotI, 13 μl mili-Q H_2O a 12 μl 10 \times FastDigest Buffer (ThermoFisher Scientific). Reakce probíhala ve 120 μl při 37 $^\circ\text{C}$ přes noc.

3.3.1.3 DNA gelová elektroforéza

Princip

Pomocí DNA gelové elektroforézy lze rozdělit DNA fragmenty podle jejich velikosti. Čím menší fragmenty jsou, tím snáze pronikají póry gelu, a tím rychleji se pohybují k anodě. Nukleové kyseliny mají záporný náboj díky přítomnosti fosforu, proto migrují gelem směrem k anodě. Při výrobě agarózového gelu je potřeba koncentraci agarózy přizpůsobit velikosti DNA fragmentů (používá se 1-2% agaróza). Pro vizualizaci nukleových kyselin v gelu je možné použít Ethidium bromid, SyberGreen nebo GelRed. V této práci byl použit Ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi páry bazí a pod UV světlem vyzařuje fluorescenci. Tato metoda byla použita pro ověření správné restrikce.

Postup

Byl smíchán 1 g agarózy s 99 ml 1 \times TAE pufru (40mM Tris base, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA). Agaróza byla v mikrovlnné troubě rozvařena. Po ochlazení byl přidán 1 μl Ethidium bromidu (10mg/ml). Agarózový gel byl nalit do elektroforetické vaničky, kde byl nechán zatuhnout. Elektroforetická vanička byla vložena do elektroforetické vany, kde byla zalita 1 \times TAE puftrem. Do jamek na elektroforetickém gelu bylo nanášeno 10 μl DNA žebříčku (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Invitrogen, 1 Kb) a 4 μl vzorku (1 μg) smíchaných s nanášecím puftrem. Elektroforéza byla spuštěna na 90 V po dobu 30 minut. Poté byl gel vizualizován pomocí přístroje ChemiDoc MP (BIO-RAD).

3.3.1.4 Precipitace plazmidové DNA

Princip

Precipitace plazmidové DNA probíhá pomocí vychlazeného ethanolu. Pro lepší vysrážení se přidávají soli (v této práci byl použit octan sodný), které zajišťují ztrátu náboje DNA, což napomáhá k její nerozpustnosti.

Postup

K roztoku plazmidové DNA bylo přidáno 24 μl 3M octanu sodného (pH=5.2) a 300 μl 96% ethanolu. Srážení probíhalo 30 minut při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl vzorek stočen při 12000 x g, 4°C po dobu 10 minut. Pelet byl promyt 70% ethanolem.

3.3.1.5 Transfekce AOX do trypanozóm

Princip

Transfekce je proces vnesení cizorodé nukleové kyseliny do eukaryotické buňky. Do buněk se vkládají plazmidy nesoucí gen, který chceme, aby buňka exprimovala. Dále plazmidy obsahují rezistenci na antibiotika, jejichž přítomnost zajišťuje přežívání pouze jedinců, kteří obsahují daný plazmid. Transfekce se provádí elektroporací nebo tepelným šokem. Během elektroporace dochází k permeabilizaci membrány, což způsobí, že se do buňky začnou dostávat látky z okolí.

Postup

Bylo stočeno 5×10^7 buněk při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a buňky byly promyty 1 ml chlazeného PBS-G (1xPBS, 6mM glukóza). Buňky byly přemístěny do nové mikrokumavky a byly stočeny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1300 x g po dobu 10 minut. Do elektrokyvety bylo napipetováno 10 μl linearizované plazmidové DNA (10-12 μg) a elektrokyveta byla ponechána na ledě. Pelet buněk byl smíchán se 100 μl roztoku Amaxa Nucleofector® systém. Poté byly buňky přemístěny do elektrokyvety. Byla provedena transfekce pomocí elektroporátoru (AMAXA, program X-014). Po transfekci byly buňky několik minut ponechány na ledě a poté byly přidány do 6 ml média (SDM 79 s 10% FBS, geneticin 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hygromycin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po 16 hodinách bylo přidáno 6 ml média (SDM 79 s 10% FBS) s 24 μl selekčního antibiotika puromycin (konečná koncentrace 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.3.2 Spuštění over-exprese alternativní oxidázy

Over-exprese alternativní oxidázy byla spuštěna pomocí tetracyklinu. Tetracyklin v buňce reguluje aktivitu T7 RNA polymerázy, na základě inducibilního systému. V přítomnosti tetracyklinu se tedy aktivuje T7 RNA polymeráza, což spouští expresi genu. V průběhu pokusu byl k buňkám přidáván tetracyklin s počáteční koncentrací 1 µg/ml (T1), později byla jeho koncentrace zvýšena na 5 µg/ml (T5).

3.4 Ověření over-exprese alternativní oxidázy

3.4.1 Western blot analýza

3.4.1.1 SDS gelová elektroforéza

Princip

Tato metoda umožňuje separaci proteinů podle jejich velikosti. Proteiny jsou před separací denaturovány, což je zajištěno pomocí SDS PAGE nanášecího pufru a následnou inkubací při 97 °C. Zároveň pomocí SDS PAGE nanášecího pufru proteiny získávají záporný náboj, díky kterému migrují k anodě. Rychlost migrace proteinů v polyakrylamidovém gelu je přímo závislá na jejich velikosti, jelikož menší proteiny dokážou snáze pronikat hustým gelem.

Postup

Z neindukované linie buněk 29-13 bylo předem vytvořeno několik indukovaných linií. Z každé linie bylo odebráno 1×10^7 buněk. Vzorky byly stočeny v centrifuze při 4 °C a 1300 x g. Médium bylo odstraněno a pelet byl promyt 1 ml 1×PBS (10mM fosfátový pufr, 130mM NaCl). Následně byly buňky stočeny při 4 °C a 1300 x g. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 20 µl 1×PBS a 10 µl 3×SDS PAGE nanášecího pufru. Buňky byly inkubovány 8 minut při teplotě 97 °C. Byla sestavena elektroforéza, do jamek na polyakrylamidovém gelu (BIO-RAD, mini-protean TGX stain-free precast gel) bylo nanášeno 4 µl markeru (Prestained Protein ladder, Thermo Scientific) a 20 µl od každého vzorku. Elektroforéza byla spuštěna v SDS-running pufru (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0.1% SDS, d. H₂O) na 180 V po dobu 30 minut. Po 30 minutách byly všechny proteiny separovány podle jejich velikosti. Následně byla použita metoda western blot analýzy pro detekci proteinu AOX.

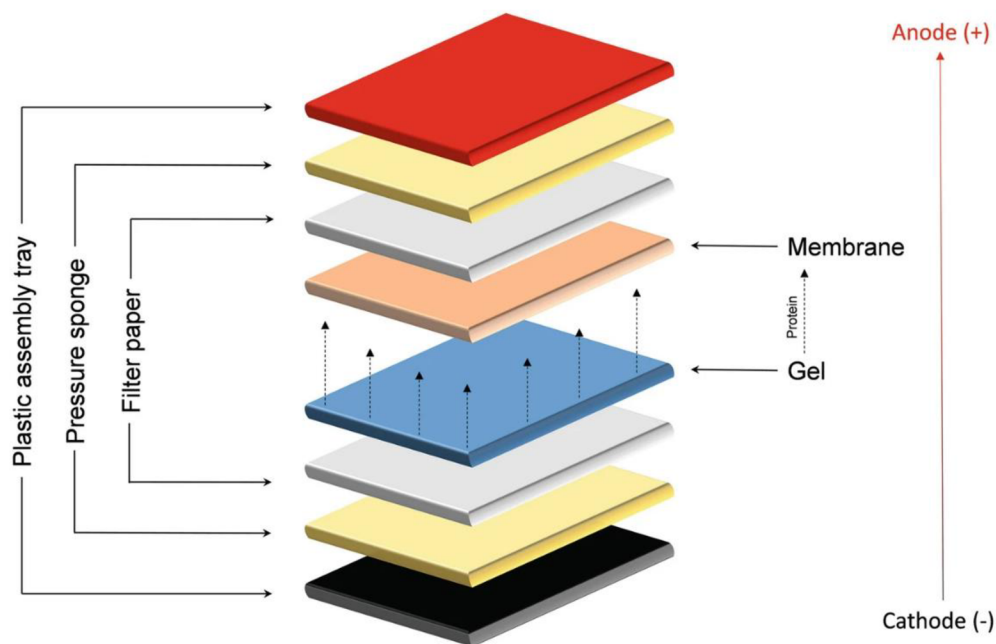
3.4.1.2 Western blot analýza

Princip

Western blot analýza umožňuje ve směsi proteinů vyskytujících se v daném vzorku detekovat jeden určitý. Aby tato metoda mohla být provedena, je potřeba nejprve separovat proteiny pomocí metody SDS gelové elektroforézy. Následně jsou proteiny přeneseny z polyakrylamidového gelu na povrch PVDF membrány, na jejímž povrchu jsou detekovány specifickými protilátkami. Detekce samotná je zajištěna pomocí chemiluminiscence. Na primární protilátku se váže daná sekundární protilátka, která je spojená s reportérovým enzymem. Po přidání substrátu dochází k jeho reakci s tímto enzymem a uvolnění luminiscence, která může být zaznamenána přístrojem s CCD kamerou.

Postup

Separované proteiny pomocí metody SDS gelové elektroforézy byly přeneseny z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu (BioTRace™ PVDF–GeneTiCA). Byla sestavena transferová elektroforéza. Schéma transferového sendviče je vidět na obrázku 7. Membrána byla před použitím aktivována methanolem po dobu jedné minuty, poté omyta destilovanou vodou a poté 1× transfer pufrém (25mM Tris, 192mM glycin, 20% ethanol). Přenos proteinů na membránu byl zajištěn v 1× transfer pufru pomocí zavedení elektrického proudu 90 V po dobu 90 minut. Pro zabránění vazby protilátky přímo na membránu a vzniku slabých nespecifických vazeb, byl na membráně vytvořen mléčný film z 5% mléka (bylo smícháno 5 g sušeného mléka s 95 ml 1x PBS-T (milli-Q H₂O, 0.05% Tween 20, 1×PBS). V tomto roztoku byla membrána ponechána přes noc. Druhý den byl obsah mléka slit na objem 5 ml a byla přidána myši primární protilátka α –V5 (Invitrogen, v poměru 1:2000). Po hodině inkubace za stálého promíchávání byla membrána promyta 1x PBS-T (nejprve bylo provedeno třikrát rychlé promytí, poté třikrát míchána po 10 minutách). PBS-T bylo slito, k membráně bylo přidáno 5 ml 5% mléka a byla přidána kozí sekundární protilátka α –mouse HRP (Biorad, v poměru 1:2000) a membrána byla inkubována další hodinu. Poté byla membrána promyta PBS-T (třikrát rychlé promytí, poté třikrát míchána po 10 minutách). Následně, za použití substrátu ECL (BIO-RAD, Clarity Western ECL substrate) byl detekován protein AOX-V5 pomocí luminiscence, zaznamenané přístrojem ChemiDoc MP (BIO-RAD). Tato metoda byla použita pro detekci dalších proteinů, seznam proteinů včetně použitých protilátek je uveden v tabulce I.



Obr. 7: Schéma Western blot transferového sendviče (C. Martins-Gomes & A. M. Silva, *Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents* 2018).

Tab. I: Seznam použitých protilátek při metodě western blot.

Primární protilátka	Ředění	Výrobce	Sekundární protilátka	Ředění	Výrobce
myší α V5	1:2000	Invitrogen	kozí α mouse	1:2000	Biorad
králíčí α cox IV	1:1000	Výrobno v laboratoři	kozí α rabbit	1:2000	Biorad
myší α Hsp70	1:2000	Z publikace Panigrahi A. K. et al., 2008	kozí α mouse	1:2000	Biorad
králíčí α Rieske	1:1000	Výrobno v laboratoři	kozí α rabbit	1:2000	Biorad
myší α TAO	1:1000	Dar od Prof. Chaudhuri	kozí α mouse	1:2000	Biorad

3.4.2 Digitoninová subcelulární frakcionace

Princip

Digitonin je detergent, který rozpouští lipidy jako např. cholesterol přítomný v buněčné membráně. Inkubace buněk s digitoninem způsobuje permeabilizaci membrány. Následnou centrifugací tak lze oddělit organely od cytozolu. Pomocí dalších metod (SDS PAGE gelová elektroforéza, western blot a detekce protilátkami) je možné detekovat, ve které části buňky se vyskytuje sledovaný protein.

Postup

3.4.2.1 Frakce celých buněk

Bylo odebráno 1×10^7 buněk/ml. Buňky byly stočeny při 1300 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a k buňkám byl přidán 1 ml PBS-G (1×PBS, 6mM glukóza). Buňky byly stočeny při 1300 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 100 μ l 1×PBS a 50 μ l 3×SDS PAGE nanášecího pufru. Vzorky byly inkubovány při 97 °C po dobu 7 minut.

3.4.2.2 Organelární a cytozolická frakce

Bylo odebráno 1×10^8 buněk/ml. Buňky byly stočeny při 1300 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a k buňkám byl přidán 1 ml PBS-G. Buňky byly stočeny při 1300 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 500 μ l SoTE (mili-Q H₂O, 20mM Tris-HCl (pH=7.5), 0.6M Sorbitol, 2mM EDTA) a 500 μ l SoTE s 0.03% digitoninem. Vzorky byly inkubovány 5 minut na ledu, poté byly stočeny při 4500 x g, 4 °C po dobu 3 minut. Byl odebrán supernatant (cytozolická frakce) do nové mikrozkušavky a vzorek byl vložen na led. Bylo odebráno 100 μ l cytozolu do nové mikrozkušavky. K cytosolu bylo přidáno 50 μ l SDS PAGE nanášecího pufru. K peletu, který obsahoval organely, byl přidán 1 ml PBS, následně bylo odebráno 100 μ l do nové mikrozkušavky. K organelární frakci bylo přidáno 50 μ l 3×SDS PAGE nanášecího pufru. Vzorky byly inkubovány při 97 °C po dobu 7 minut.

Proteiny byly rozděleny pomocí SDS PAGE gelové elektroforézy. Pomocí metody western blot byly proteiny přeneseny na PVDF membránu, kde byly detekovány pomocí protilátek. Použité protilátky jsou uvedeny v tabulce II.

Tab. II: Použité protilátky při metodě digitoniová subcelulární frakcionace.

Primární protilátka	Ředění	Výrobce	Sekundární protilátka	Ředění	Výrobce
myší α V5	1:2000	Invitrogen	kozí α mouse	1:2000	Biorad
králíčí α APRT	1:200	Vyrobeno v laboratoři	kozí α rabbit	1:2000	Biorad
myší α Hsp70	1:2000	Z publikace Panigrahi A. K. et al., 2008	kozí α mouse	1:2000	Biorad

3.4.3 IFA

Princip

IFA je metoda, při které dochází k detekci určitého proteinu pomocí specifických protilátek konjugovaných s fluorescenční barvou (v našem případě FITC). Detekce může být prováděna přímo pomocí vazby protilátky, konjugované s fluorescenční barvou, na antigen nebo nepřímo pomocí vazby primární protilátky na antigen a následně vazbou sekundární protilátky, konjugované s fluorescenční barvou, na primární (v této práci byla použita nepřímá metoda). Před přidáním protilátek je potřeba buňky fixovat pomocí formaldehydu a permeabilizovat membrány pomocí Tritonu X-100. Následně probíhá vazba protilátek na antigen za takových podmínek, aby byla co nejvíce specifická. Pro vizualizaci výsledků je pak použit fluorescenční mikroskop.

Postup

Bylo odebráno 2×10^7 buněk/ml. Buňky byly stočeny pomocí centrifugy při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a pelet byl promyt v 1 ml 1×PBS (pH= 7.4). K výslednému peletu bylo přidáno 200 µl 1×PBS. Následně byla provedena fixace buněk pomocí 200 µl roztoku formaldehydu (7.4% formaldehyd, 1×PBS). Z každého vzorku bylo nanášeno 40 µl na krycí sklíčko. Vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Poté byl odebrán fixační roztok a buňky byly třikrát promyty 100 µl 1×PBS. Následně byla provedena permeabilizace membrán 100 µl roztoku Triton X-100 (0.1% Triton X-100, 1×PBS) po dobu 10 minut. Roztok byl odebrán a buňky byly třikrát promyty 100 µl 1×PBS. Pro minimalizaci vzniku nespecifických vazeb byly buňky blokovány jednu hodinu 100 µl blokovacího činidla (5.5% FBS, 1×PBS-T). Po hodině bylo odebráno blokovací činidlo a buňky byly dvakrát promyty 100 µl 1×PBS. Následně bylo přidáno 40 µl myší primární protilátky (α V5, v poměru 1:200) v roztoku BSA (3% Bovine serum albumine, 1×PBS). Buňky byly s primární protilátkou inkubovány hodinu. Následně byl odebrán roztok a buňky byly promyty třikrát 100 µl 1×PBS-T a dvakrát 100 µl 1×PBS. Bylo přidáno 40 µl kozí sekundární fluorescenční protilátky (α mouse-FITC, v poměru 1:200,) v BSA. Buňky byly inkubovány 50 minut ve tmě. Roztok byl odebrán, buňky byly promyty třikrát 100 µl 1×PBS-T a dvakrát 100 µl 1×PBS. K buňkám bylo přidáno montážní médium Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (ThermoFisher). Bylo přiloženo podložní sklíčko a preparát byl mechanicky stlačen. Vzorek byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem (Axioplan 2 Zeiss Fluorescence Microscope).

3.5 Mapování buněčného dýchání po indukci alternativní oxidázy

3.5.1 Měření respirace

Princip

Tato metoda umožňuje zaznamenávat spotřebu kyslíku buňkami a porovnávat ji mezi dvěma vzorky. K měření se používá přístroj 22xygrafu (v této práci byl použit OroborosO2k). Přístroj obsahuje dvě komůrky (o objemu 2 ml), do kterých se přidává speciální respirační médium (použito MiR05, Oroboros Instrument) a buňky. Použitím různých substrátů a inhibitorů lze sledovat vliv jednotlivých membránových komplexů na respiraci. V této práci byla tato metoda použita pro porovnání vlivu komplexu IV (cytochrom c oxidáza) respiračního řetězce a AOX (alternativní oxidázy) na respiraci.

Postup

Bylo stočeno 2×10^7 buněk/ml při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a buňky byly dvakrát promyty v 1 ml média Mir05 (0.5mM EGTA, 3mM MgCl₂, 60mM Lactobionic acid, 20mM Taurine, 10mM KH₂PO₄, 20mM HEPES, 110mM D-Sucrose). K peletu bylo přidáno 100 µl Mir05. Do přístroje (OroborosO2k) byly napipetovány 2 ml média Mir05. Po ustálení teploty a kalibraci tlaku kyslíku byl do komůrek napipetován celý obsah vzorků. Poté, co již nedocházelo ke změnám koncentrace kyslíku v komůrkách (buňky vyčerpaly endogenní respirační substráty) byl přidán 5mM prolin, který sloužil jako substrát. Když došlo k ustálení nárůstu respirace, byl přidán 1mM KCN (inhibitor komplexu IV), a po ustálení poklesu byl přidán 250µM SHAM (inhibitor AOX). Takto byl stanoven poměr respirace citlivé na KCN a na SHAM.

3.6 Vliv over-exprese alternativní oxidázy na růst buněk

3.6.1 Růstová křivka

Princip

Růstová křivka znázorňuje závislost růstu populace na čase a dalších faktorech (v tomto případě: spuštění exprese alternativní oxidázy). Při pozorování, zda má určitý faktor opravdu vliv na růst buněk, je vhodné skupinu porovnat s kontrolní skupinou, u které nedošlo k žádným změnám (nebyla spuštěna exprese alternativní oxidázy). Pro zhotovení růstové křivky je potřeba měřit denzitu kultury každý den ve stejný čas. Jelikož procyklická forma

Trypanosoma brucei je schopná pravidelného dělení jen v rozmezí koncentrací 1×10^6 - 2×10^7 buněk/ml, je potřeba její koncentraci po změření následně naředit na původní koncentraci $1-2 \times 10^6$ buněk/ml. Koncentraci buněk je možné změřit pomocí přístroje (v této práci byl použit Beckman Coulter Z2) nebo spočítat pomocí Neubauerovy komůrky, kdy se spočítá množství buněk ve 4 čtvercích a následně se vypočte koncentrace buněk/ml. V této práci byla růstová křivka použita pro porovnání růstu populací neindukovaných a indukovaných linií, u kterých byla spuštěna exprese alternativní oxidázy. Zároveň byla růstová křivka použita pro porovnání vlivu alternativní oxidázy na růst buněčné populace při rozdílné dostupnosti živit (aminokyseliny – SDM 80 médium nebo glukóza – SDM 79 médium).

Postup

Bylo odebráno 100 μ l buněk z každé linie. Buňky byly fixovány přidáním 100 μ l TrypFixu (1x SSC – citrátový pufr, 3.6% Formaldehyd). Do kyvet bylo odebráno 5 ml Hemosolu a 50 μ l nafixovaných buněk. Koncentrace buněk v 1 ml byla změřena pomocí přístroje Beckman Coulter Z2. Buňky byly zředěny podle jejich změřené koncentrace tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 2×10^6 buněk/ml. Jako ředící roztok bylo použito médium, ve kterém buňky rostly SDM 79 či SDM 80. Při ředění byly z původní linie vytvořeny dvě linie o koncentraci 2×10^6 buněk/ml. Jedna z linií byla indukována přidáním tetracyklinu (1 μ g/ml nebo 5 μ g/ml). Buňky byly inkubovány 24 hodiny v inkubátoru při 27 °C. Následující den (den měření růstové křivky č. 1) byla ve stejnou dobu změřena koncentrace buněk/ml. Buňky byly zředěny na původní koncentraci 2×10^6 buněk/ml. K indukované linii bylo přidán tetracyklin (1 μ g/ml nebo 5 μ g/ml). Následující dny byly stejným způsobem ve stejnou dobu změřeny koncentrace a buňky byly naředěny na koncentraci 2×10^6 buněk/ml.

3.7 Vliv over-exprese alternativní oxidázy na základní funkce mitochondrie

3.7.1 Měření membránového potenciálu

Princip

Membránový potenciál byl měřen pomocí průtokové cytometrie. Do kapiláry jsou nasáty buňky, které jsou ozářeny laserem a následně je zaznamenána jejich fluorescence. Při přípravě vzorků jsou buňky inkubovány s fluorescenční barvou (v této práci bylo použito TMRE), která se dostává dovnitř aktivních mitochondrií (mitochondrie, u kterých dochází

k přenosu protonů) (převzato ze stránky Cell Signaling Technology®). K přenosu protonů dochází díky respiračním komplexům během dýchacího řetězce. Očekávalo se, že buňky, u kterých byla spuštěna exprese alternativní oxidázy budou mít menší membránový potenciál než buňky bez alternativní oxidázy. Membránový potenciál totiž na vnitřní mitochondriální membráně vzniká přenosem protonů z prostoru mitochondriálního matrixu do mezimembránového prostoru během dýchacího řetězce. V případě, že v buňce není přítomna alternativní oxidáza, dochází k větší koncentraci záporných iontů v prostoru matrixu a protonů v mezimembránovém prostoru. V případě, kdy buňka používá alternativní oxidázu, nedochází k přenosu protonů respiračními komplexy.

Postup

Bylo stočeno 5×10^6 buněk/ml při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a k buňkám bylo přidáno 0.5 ml média ve kterém buňky rostly v tkáňových kulturách (SDM 79 nebo SDM 80) s fluorescenční barvou 60nM TMRE. K jednomu vzorku, který sloužil pro nastavení přístroje, bylo přidáno samotné medium bez fluorescenční barvy. Dále byla vytvořena negativní kontrola membránového potenciálu přidáním 1 μ l 20 μ M FCCP. Vzorky byly otevřené a přikryté alobalem uložené do inkubátoru (27 °C) po dobu 30 minut. Po každých deseti minutách byly vzorky lehce protřepány. Po půl hodině byly buňky stočeny při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a buňky byly promyty 1 \times PBS (pH = 7.4). Buňky byly stočeny při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a k buňkám byl přidán 1 ml 1 \times PBS (pH = 7.4). Vzorky byly přeneseny do FACS zkumavek a byl k nim přidán 1 ml 1 \times PBS (pH = 7.4). Membránový potenciál byl změřen pomocí přístroje FACS (BD FACS Canto II) pod PE filtrem.

3.7.2 Měření mitochondriálních radikálů kyslíku

Princip

Radikály jsou molekuly, které obsahují alespoň jeden nepárový elektron. Přítomnost nepárového elektronu způsobuje vysokou reaktivitu. Volné radikály kyslíku vznikají v mitochondriích jako vedlejší produkt dýchacího řetězce. Během dýchacího řetězce může dojít k úniku elektronů z komplexu I nebo komplexu III, tyto elektrony pak reagují s kyslíkem za vzniku superoxidu. Radikály kyslíku lze měřit pomocí průtokové cytometrie. Při měření mitochondriálních radikálů kyslíku se používá fluorescenční barva MitoSOX. MitoSOX je

akumulován v mitochondriích, kde je za přítomnosti superoxidu oxidován a vyzařuje fluorescenci (převzato ze stránky Thermo Fisher Scientific).

Postup

Bylo stočeno 1×10^7 buněk/ml při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a k buňkám byl přidán 1 ml média (SDM 79 nebo SDM 80) s fluorescenční barvou 5 μ M MitoSOX. K jednomu vzorku, který sloužil pro nastavení přístroje, bylo přidáno samotné medium bez fluorescenční barvy. Vzorky byly otevřené a přikryté alobalem inkubovány při 27 °C po dobu 30 minut, po každých 10 minutách byly vzorky lehce protřepány. Po půl hodině byly buňky stočeny při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a buňky byly promyty 1 \times PBS (pH = 7.4). Buňky byly stočeny při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a k buňkám byl přidán 1 ml 1 \times PBS. Vzorky byly přeneseny do FACS zkumavek a byl k nim přidán 1 ml 1 \times PBS. Mitochondriální radikály kyslíku byly změřeny v přístroji FACS (BD FACS Canto II) pod PE filtrem.

3.7.3 Měření celulórních radikálů kyslíku

Princip

V této metodě jsou měřeny celulórní radikály kyslíku (peroxid vodíku), které vznikají ze superoxidu. Vznik superoxidu je vysvětlen v kapitole 5.2. Dvě molekuly superoxidu se mohou rozdělit a reagovat s molekulou vody za vzniku peroxidu vodíku, který je schopný procházet mitochondriální membránou do cytoplazmy. Při měření celulórních radikálů kyslíku se používá fluorescenční barva DCFH-DA, ta je v buňce pomocí esteráz hydrolyzována na DCFH (A. R. Rosenkranz et al., 1992). DCFH je v přítomnosti radikálů kyslíku oxidován na molekulu DCF, která vyzařuje fluorescenci (A. R. Rosenkranz et al., 1992).

Postup

Byly vytvořené vzorky o narůstajícím množství H_2O_2 , které sloužily jako kontrola peroxidu vodíku (0 μ M H_2O_2 , 200 μ M H_2O_2 , 400 μ M H_2O_2 a 800 μ M H_2O_2). Bylo stočeno 1×10^7 buněk/ml při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a k buňkám byl přidán 1 ml média (SDM 79 nebo SDM 80) s fluorescenční barvou DCFH-DA (1:1000). K jednomu vzorku, který sloužil pro nastavení přístroje, bylo přidáno samotné medium bez fluorescenční barvy. Vzorky byly otevřené a přikryté alobalem uložené do inkubátoru (27 °C) po dobu 30 minut. Po každých deseti minutách byly vzorky lehce protřepány. Po půl hodině

byly buňky stočeny pomocí centrifugy při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Bylo odebráno médium a buňky byly promyty 1 ml 1×PBS (pH= 7.4). Buňky byly stočeny při 25 °C, 1300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a k buňkám byl přidán 1 ml 1×PBS. Vzorky byly předány do FACS zkumavek a byl k nim přidán 1 ml 1×PBS. Celulární radikály kyslíku byly změřeny v přístroji FACS (BD FACS Canto II) pod FITC filtrem.

4 Výsledky

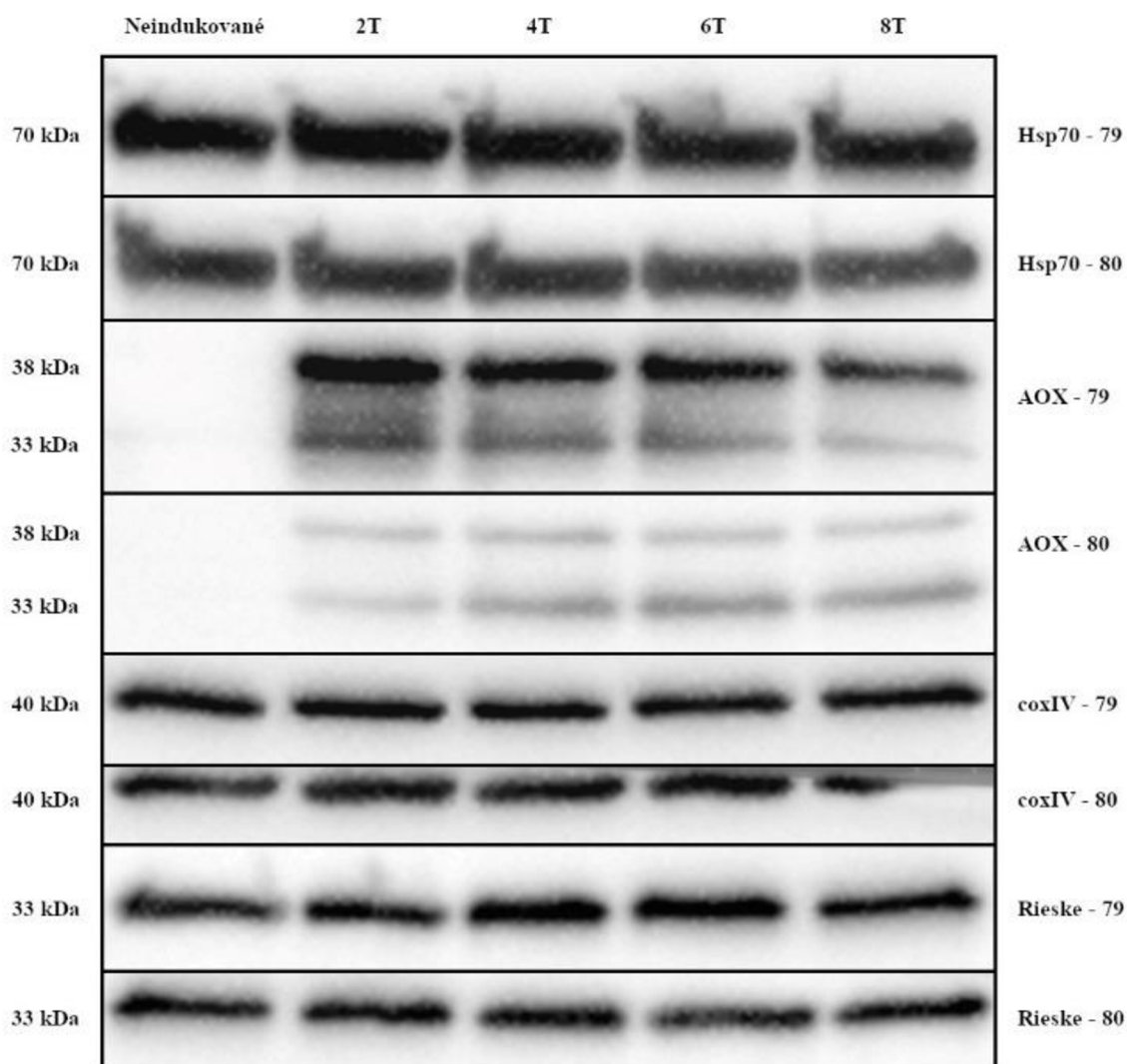
4.1 Ověření over-exprese AOX

4.1.1 Ověření over-exprese v buněčných lyzátech metodou western blot

Over-exprese AOX (alternativní oxidázy) byla ověřena pomocí metody western blot. Během prvotního pokusu byly použity čtyři nezávisle vyselektované buněčné linie overexprimující AOX a tyto linie byly indukovány tetracyklinem po dobu 2 a 4 dnů v médiu SDM 79. Detekcí epitopu V5 (epitop V5 se nachází na C-terminálním konci AOX) pomocí protilátek byla ověřena over-exprese AOX (Obrázek 8) u linií neindukovaných (linie ke kterým nebyl přidáván tetracyklin) a indukovaných (linie ke kterým byl přidán tetracyklin) po dobu 2 a 4 dnů. U neindukovaných linií se protein vyskytoval jen ve velmi nízké koncentraci, což může indikovat nízkou expresi AOX i v absenci tetracyklinu (Obrázek 8). Zatímco u indukovaných linií se protein vyskytoval ve vysoké koncentraci (Obrázek 8).

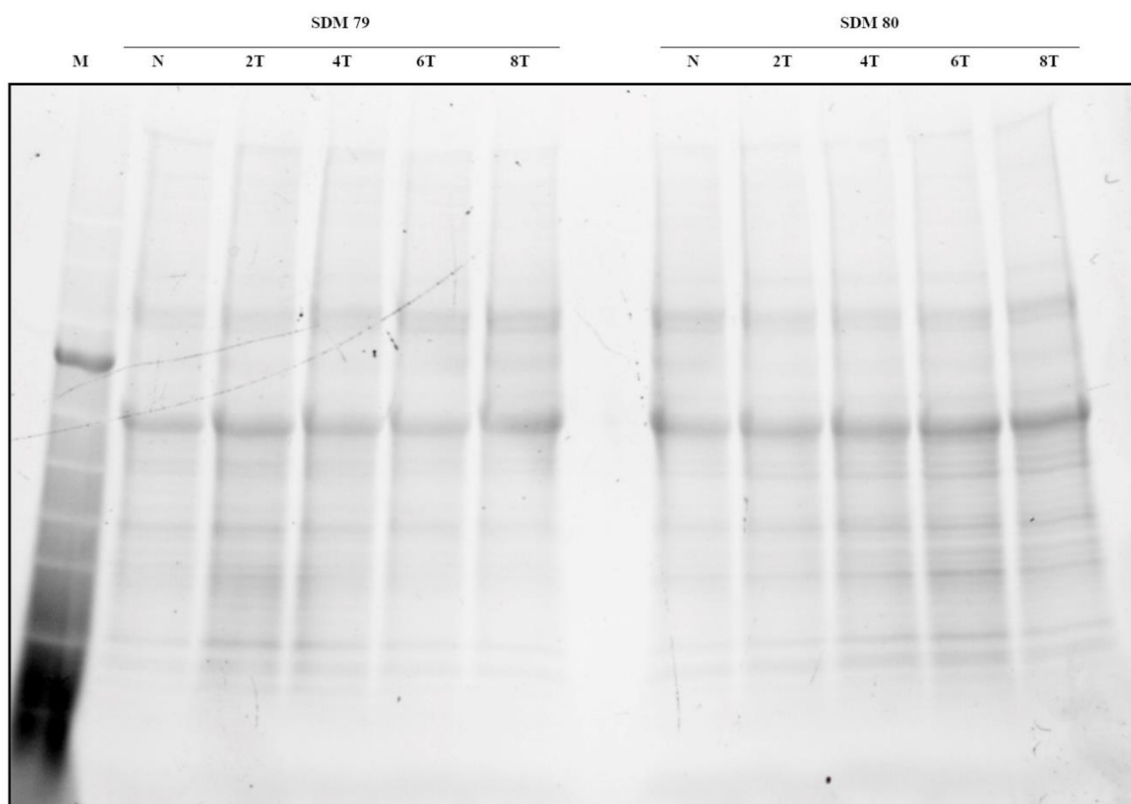
Intenzita over-exprese AOX byla u buněk inkubovaných v médiu prolinem lehce slabší než u buněk inkubovaných v médiu s glukózou (Obrázek 9). Ač vyobrazeno zvlášť, vzorky z obou medií byly nanесeny na stejný gel a western blot analýza proběhla na jedné membráně. Tento experiment byl proveden pouze jednou, a proto bude nutné ho zopakovat pro potvrzení tohoto zajímavého fenotypu.

Dále bylo zjištěno, že nebyla změněna intenzita exprese dalších membránových proteinů, jako jsou Rieske (podjednotka komplexu III) a coxIV (podjednotka komplexu IV). Oba proteiny byly zastoupeny ve všech liniích v přibližně stejné intenzitě (Obrázek 9). Díky kontrole Hsp70, která se měla vyskytovat ve všech liniích, bylo ověřeno, že vzorky byly připraveny ze všech linií ve stejné koncentraci, byly stejnoměrně nanесeny na gel a buňky neprocházely znatelným stresem, jenž by se projevil na zvýšené expresi tohoto proteinu (Obrázek 9). Na základě těchto výsledků můžeme usuzovat, že over-exprese AOX nevede ke změnám exprese námi detekovaných proteinů.



Obr. 9: *Ověření over-exprese AOX u C2 linie metodou western blot za použití α TAO. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, 2T – linie indukované 2 dny s tetracyklinem, 4T – linie indukované 4 dny s tetracyklinem, 6T – linie indukované 6 dní s tetracyklinem, 8T – linie indukované 8 dní s tetracyklinem, 79 – inkubační médium SDM 79, 80 – inkubační médium SDM 80.*

Na obrázku 10 lze vidět snímek reprezentativního neznačeného SDS gelu s rozdělenými proteiny, který sloužil jako kontrola ověření správného nanášení vzorků.



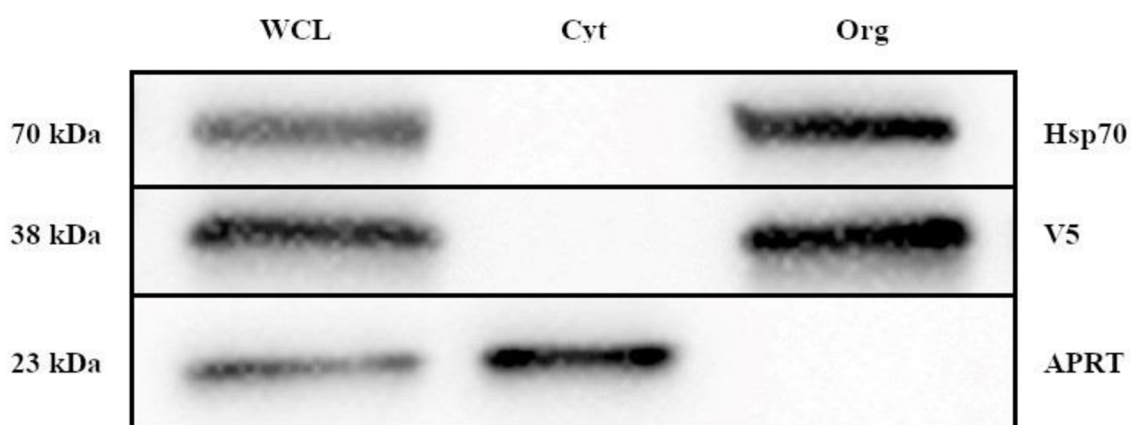
Obr. 10: Neznačený gel (BIO-RAD, mini-protean TGX stain-free precast gel) použitý jako kontrola rovnoměrného nanášení vzorků pro následující metodu western blotu.

4.1.2 Ověření over-exprese alternativní oxidázy ve správné části buňky

Poté, co bylo ověřeno, že u indukovaných buněk s tetracyklinem dochází k over-expresi AOX, bylo potřeba zjistit, zda je protein lokalizovaný v mitochondriích, kde by plnil svoji funkci. K tomu byla použita metoda digitoninová subcelulární frakcionace, díky které je možné ověřit, zda je protein lokalizovaný v cytozolu, nebo je importován do organel. Vzorky byly rozděleny na organelární a cytozolickou frakci pomocí metody digitoninová subcelulární frakcionace a následně western blot analýzou bylo možné ověřit, v jaké části buňky se protein vyskytuje. Protein alternativní oxidázy byl detekován pomocí protilátek proti V5 epitopu. Jako kontrola vstupních vzorků byla použita frakce celých buněk (WCL). Protilátky proti mitochondriálnímu proteinu Hsp70 a cytosolickému proteinu APRT byly využity pro ověření úspěšnosti buněčné frakcionace.

Na obrázku 11 lze vidět, že AOX se vyskytovala pouze v organelární frakci stejně jako Hsp70, zatímco APRT se vyskytoval pouze v cytozolické frakci. Tento výsledek poukazuje na fakt, že over-exprimovaná AOX je správně cílená do organel.

Metodou digitoninová subcelulární frakcionace bylo dokázáno, že protein vznikl v cytoplasmě a následně byl importován do organel. Za pomoci této metody, ale nedokážeme určit, zda byl protein importován do mitochondrie, kde by se účastnil metabolismu, nebo do jiné organely.

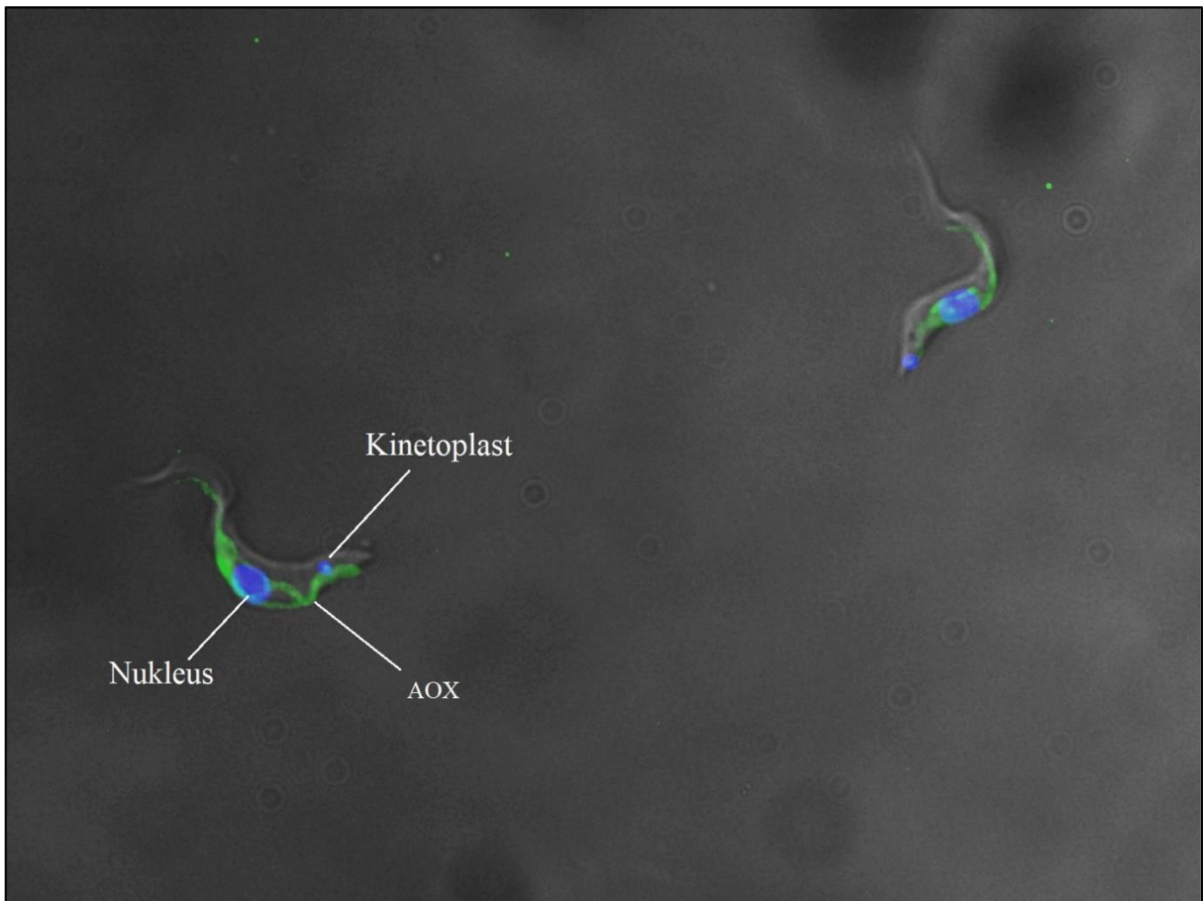


Obr. 11: Ověření over-exprese alternativní oxidázy v organelární frakci pomocí metody digitoninová subcelulární frakcionace. WCL – frakce celých buněk (Whole Cell Lysate), Cyt – cytozolická frakce, Org – organelární frakce.

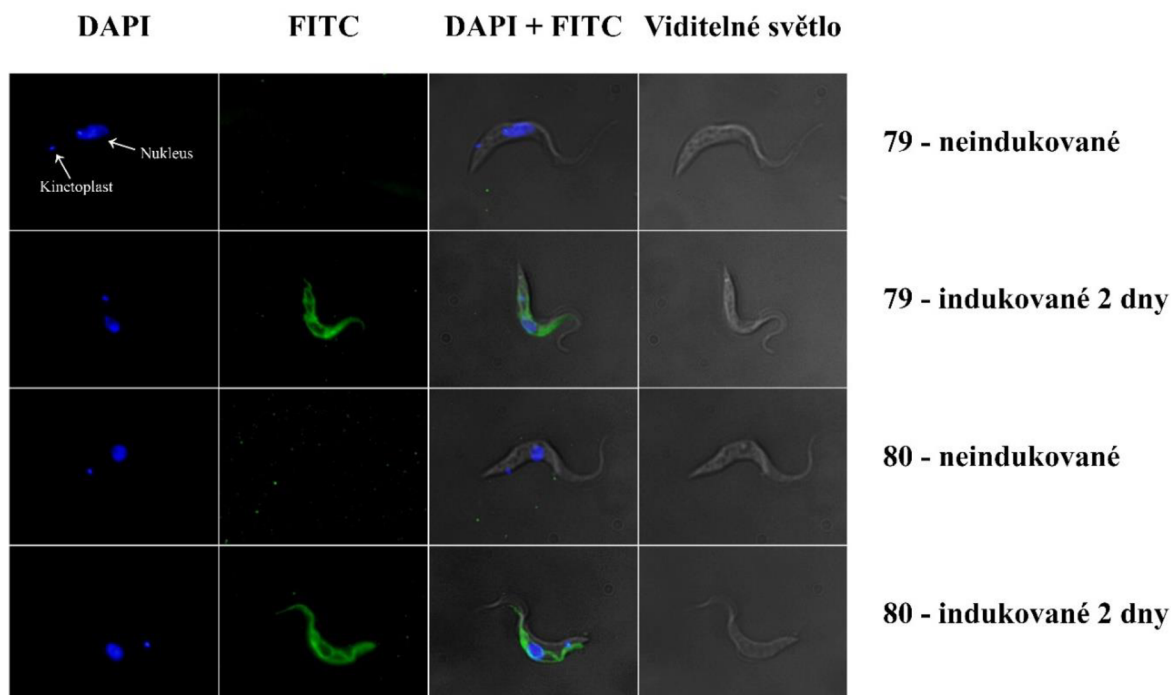
4.1.3 Ověření mitochondriální lokalizace over-exprimované AOX metodou immunofluorescence

Pomocí metody immunofluorescence assay (IFA) byla ověřena over-exprese alternativní oxidázy a také její buněčná lokalizace. Jelikož metodou digitoninová subcelulární frakcionace bylo ověřeno, že AOX se vyskytovala v organelách (Obrázek 11), bylo dále potřeba ověřit, zda je protein správně cílen do mitochondrie, kde by se účastnil metabolismu, k tomu byla použita metoda detekce pomocí imunofluorescence. Při této metodě byla použita jako kontrola fluorescenční barva DAPI, která umožnila detekovat DNA (mitochondriální a jadernou), jelikož se váže na A-T úseky DNA (Obrázek 13). Pomocí sekundární protilátky konjugované s FITC fluorescenční barvou bylo možné detekovat protein alternativní oxidázy (Obrázek 13).

Protein alternativní oxidázy se vyskytoval pouze v buňkách indukovaných s tetracyklinem a signál odpovídal typickému barvení mitochondrie (Obrázek 13). Metodou IFA na buňkách inkubovaných v SDM 79 a SDM 80 bylo ověřeno, že over-exprimovaná AOX byla importována do mitochondrie. Fluorescence byla zachycená jen u buněk, kde byla spuštěna over-exprese alternativní oxidázy pomocí tetracyklinu. Pomocí kontroly DAPI bylo ověřeno, že buňky byly v normálním stavu (over-exprese AOX nezpůsobila změny v buněčném cyklu).



Obr. 12: Ověření over-exprese alternativní oxidázy u buněk indukovaných 2 dny metodou IFA. Buňky inkubované v médiu SDM 80 + 10 % FBS. AOX – alternativní oxidáza detekovaná sekundární protilátkou (α -mouse vážící se na α -TAO) konjugovanou s fluorescenční barvou (excitace 488 nm), Nukleus – jaderná DNA detekovaná pomocí DAPI, Kinetoplast – mitochondriální DNA detekovaná pomocí DAPI. Obrázek byl vytvořený kombinací snímků DAPI, FITC a viditelného světla, zvětšení 100 \times .



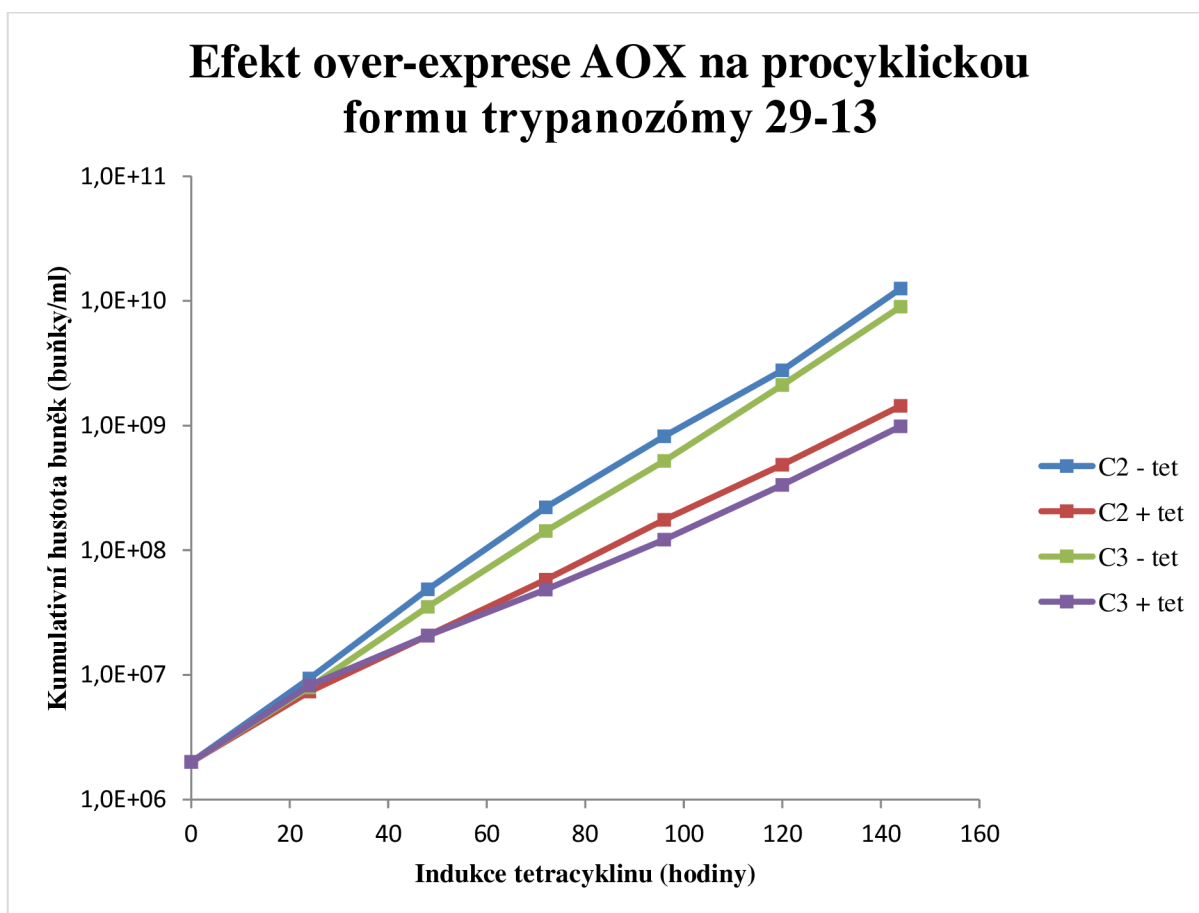
Obr. 13: Ověření over-exprese alternativní oxidázy pomocí metody IFA. DAPI – fluorescenční barva, vázající se na A-T úseky DNA, FITC – fluorescenční barva (excitace 488 nm) konjugovaná se sekundární protilátkou (α -mouse vážící se na α -TAO). DAPI + FITC – obrázek vytvořený kombinací obrázků DAPI, FITC a viditelného světla, Nukleus – jaderná DNA, Kinetoplast – mitochondriální DNA, 79 – inkubační médium SDM 79 + 10 % FBS, 80 – inkubační médium SDM 80 + 10 % FBS, neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, indukované 2 dny – linie indukované 2 dny s tetracyklinem, zvětšení 100 \times .

4.2 Zjištění vlivu over-exprese AOX na růst buněk

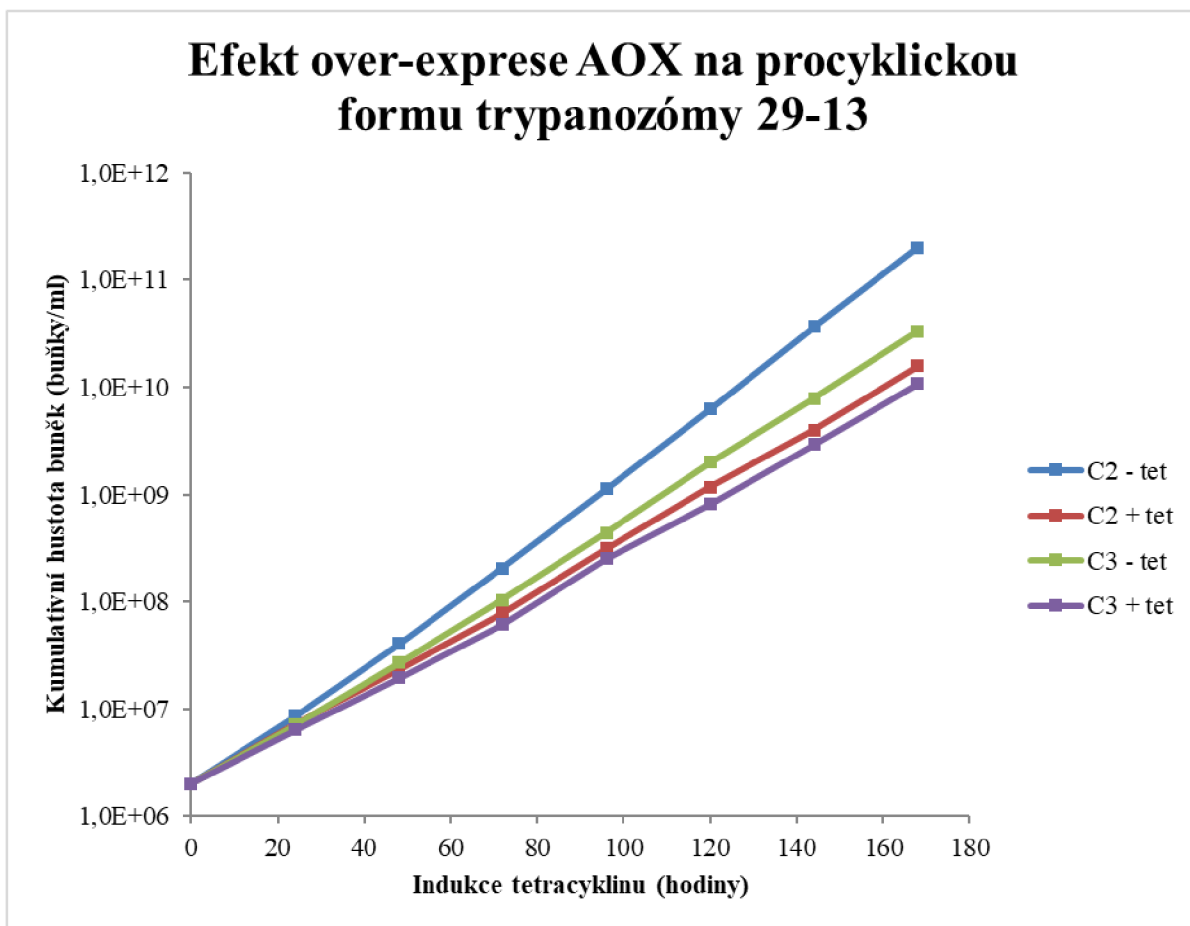
Vliv over-exprese AOX na růst buněk byl ověřen pomocí sledování růstových křivek indukovaných a neindukovaných linií a jejich následným porovnáním. Abychom zjistili, zda má AOX rozdílný vliv na růst buněk při odlišných podmínkách (přítomnost glukózy nebo prolinu), byla růstová křivka měřena u buněk inkubovaných v médiu s glukózou (Obrázek 14) a u buněk inkubovaných v médiu s prolinem (Obrázek 15).

U obou růstových křivek lze vidět negativní vliv AOX na růst buněčné populace v porovnání s kontrolní skupinou, avšak je zřetelné, že v přítomnosti glukózy byl tento vliv signifikantnější. Na obrázku 14 lze vidět, že během druhého dne došlo ke zpomalení růstu populace u indukovaných linií. Na obrázku 15 lze vidět, že neindukované linie měly po třetím dni relativní přírůstek buněčné populace větší než linie indukované s tetracyklinem.

To, že over-exprese AOX měla negativnější vliv na růst buněk v médiu s glukózou je také zřejmé z tabulky III, ve které jsou uvedeny časy potřebné ke zdvojnásobení populace pro jednotlivé buněčné linie.



Obr. 14: Efekt over-exprese alternativní oxidázy na procyklickou formu trypanozómy 29-13 v SDM 79. C2 a C3 – názvy původních linií, - tet – neindukovaná linie, + tet – indukovaná linie s tetracyklinem (1 $\mu\text{g/ml}$).



Obr. 15: Efekt over-exprese alternativní oxidázy na procyklickou formu trypanozómy 29-13 v SDM 80. C2 a C3 – názvy původních linií, - tet – neindukovaná linie, + tet – indukovaná linie s tetracyklinem (5 µg/ml).

Tab. III: Čas potřebný ke zdvojnásobení populace pro jednotlivé buněčné linie v hodinách.

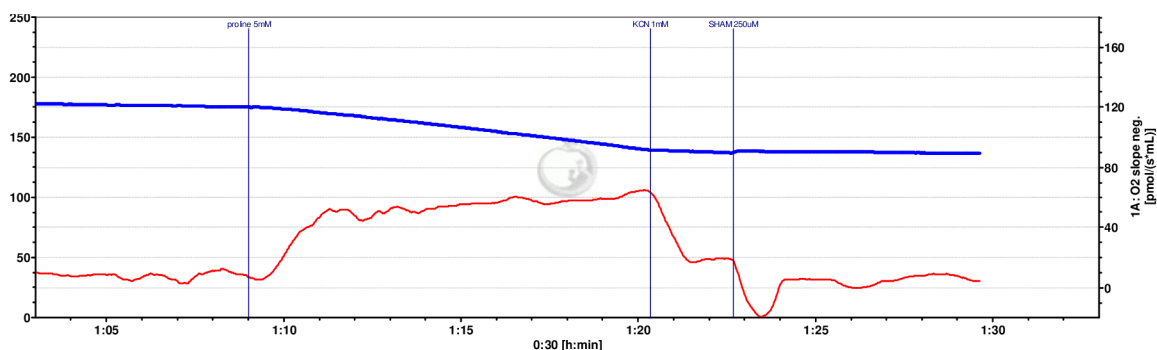
Linie	SDM 79		SDM 80	
	N	+ T	N	+ T
C2	13.98	20.08	11.76	15.81
C3	14.68	21.73	14.35	16.67

4.3 Mapování buněčného dýchání po indukci AOX

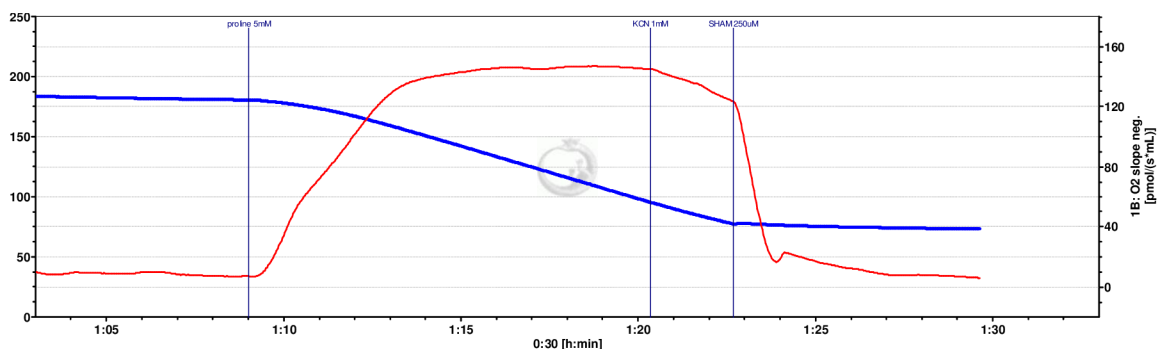
Pro zmapování buněčného dýchání přes AOX, či komplexy III a IV za přítomnosti prolinu a využití specifických inhibitorů pro AOX (salicylhydroxamic acid, SHAM) a pro komplex IV (KCN) byl použit oxygraf (OroborosO2k). Nejprve byla změřena respirace po přidání prolinu. Následně byl změřen vliv inhibice komplexu IV (cytochrom c oxidázy) pomocí 1mM KCN a poté byl změřen vliv inhibice alternativní oxidázy pomocí 250 μ M SHAM.

Na obrázcích 16 a 17 lze vidět reprezentativní snímky grafů z oxygrafu (Obrázek 16 zobrazuje vliv inhibice na neindukované linie a obrázek 17 zobrazuje vliv inhibice na linie indukované 2 dny). U obou vzorků došlo k nárůstu respirace po přidání substrátu, avšak u indukovaných linií došlo k většímu nárůstu respirace než u neindukovaných linií (Obrázky 16 a 17). U neindukovaných linií došlo k prudkému poklesu respirace, po přidání inhibitoru KCN a následně po přidání inhibitoru SHAM došlo k poklesu zbylé respirace na nulu (Obrázek 16). U indukovaných linií byl pokles způsobený KCN pouze mírný, k intenzivnějšímu poklesu došlo až po přidání SHAM (Obrázek 17).

U neindukovaných linií dosahovala celková respirace 50.80 pmol/(s·ml) a na respiraci měla větší vliv inhibice komplexu IV (62.53 %) (Obrázky 18 a 19). U indukovaných linií došlo k signifikantnímu nárůstu celkové respirace na 114.26 pmol/(s·ml) a inhibice aktivity AOX způsobila pokles o 69.92 % (Obrázky 18 a 19).

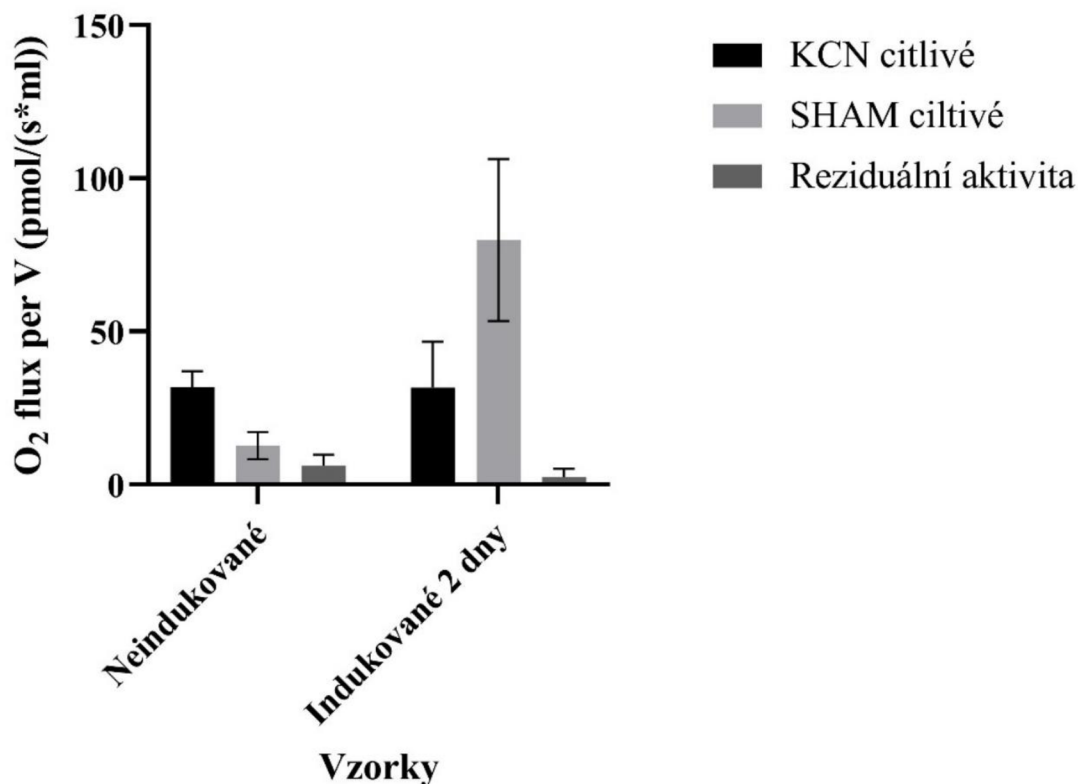


Obr. 16: Graf vlivu jednotlivých inhibitorů na respiraci neindukované linie (obrázek z oxygrafu OroborosO2k). Modrá – obsah kyslíku, červená – spotřeba kyslíku, Proline 5mM – chvíle, ve které byl přidán substrát prolin, KCN 1mM – chvíle, ve které byl přidán inhibitor KCN, SHAM 250 μ M – chvíle, ve které byl přidán inhibitor SHAM.



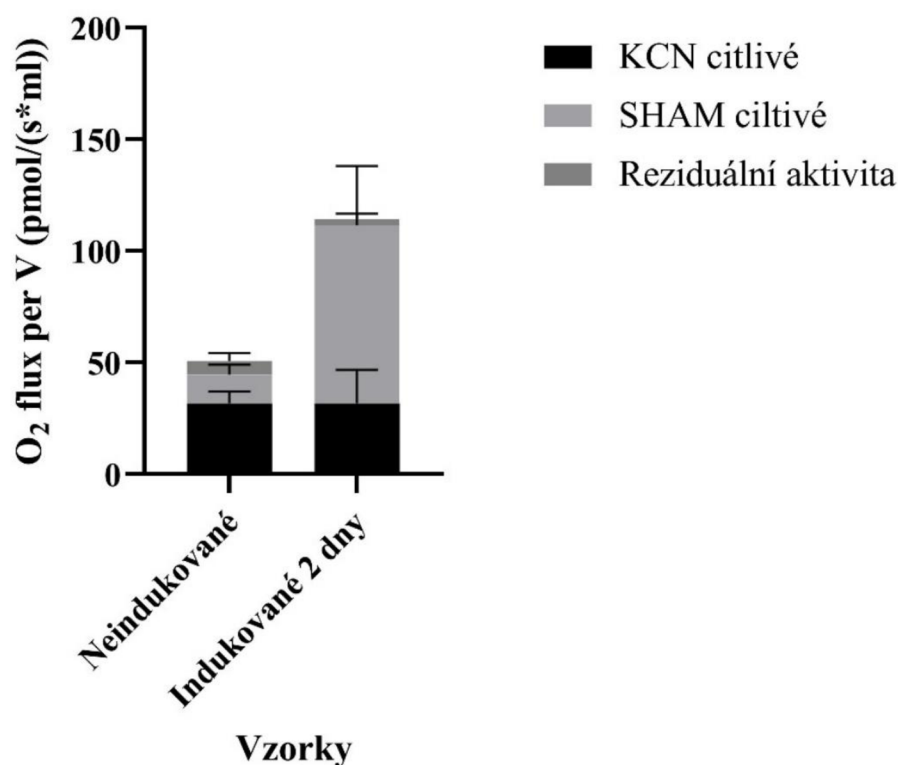
Obr. 17: Graf vlivu jednotlivých inhibitorů na respiraci linie indukované 2 dny (obrázek z oxygrafu OroborosO2k). Modrá – obsah kyslíku, červená – spotřeba kyslíku, Proline 5mM – chvíle, ve které byl přidán substrát prolin, KCN 1mM – chvíle, ve které byl přidán inhibitor KCN, SHAM 250µM – chvíle, ve které byl přidán inhibitor SHAM.

Vliv inhibice terminálních oxidáz na respiraci



Obr. 18: Vliv inhibice terminálních oxidáz na respiraci. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, Indukované 2 dny – linie indukované 2 dny tetracyklinem, KCN citlivé – ovlivnění respirace vlivem citlivosti na KCN, SHAM citlivé – ovlivnění respirace vlivem citlivosti na SHAM, reziduální aktivita – spotřeba kyslíku, pozorovatelná i po přidání inhibitorů.

Vliv inhibice terminálních oxidáz na respiraci



Obr. 19: Vliv inhibice terminálních oxidáz na respiraci. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, Indukované 2 dny – linie indukované 2 dny tetracyklinem, KCN citlivé – ovlivnění respirace vlivem citlivosti na KCN, SHAM citlivé – ovlivnění respirace vlivem citlivosti na SHAM, reziduální aktivita – spotřeba kyslíku, pozorovatelná i po přidání inhibitorů.

4.4 Ověření vlivu over-exprese AOX na základní funkce mitochondrie

AOX má kratší dráhu přenosu elektronů z kofaktoru na kyslík než respirační řetězec a během oxidace nepřenáší protony (C. Viscomi, et al., 2023). Proto nás zajímalo, zda dojde vlivem over-exprese ke změnám základních funkcí mitochondrie, jako je mitochondriální membránový potenciál a množství vyprodukovaných radikálů kyslíku.

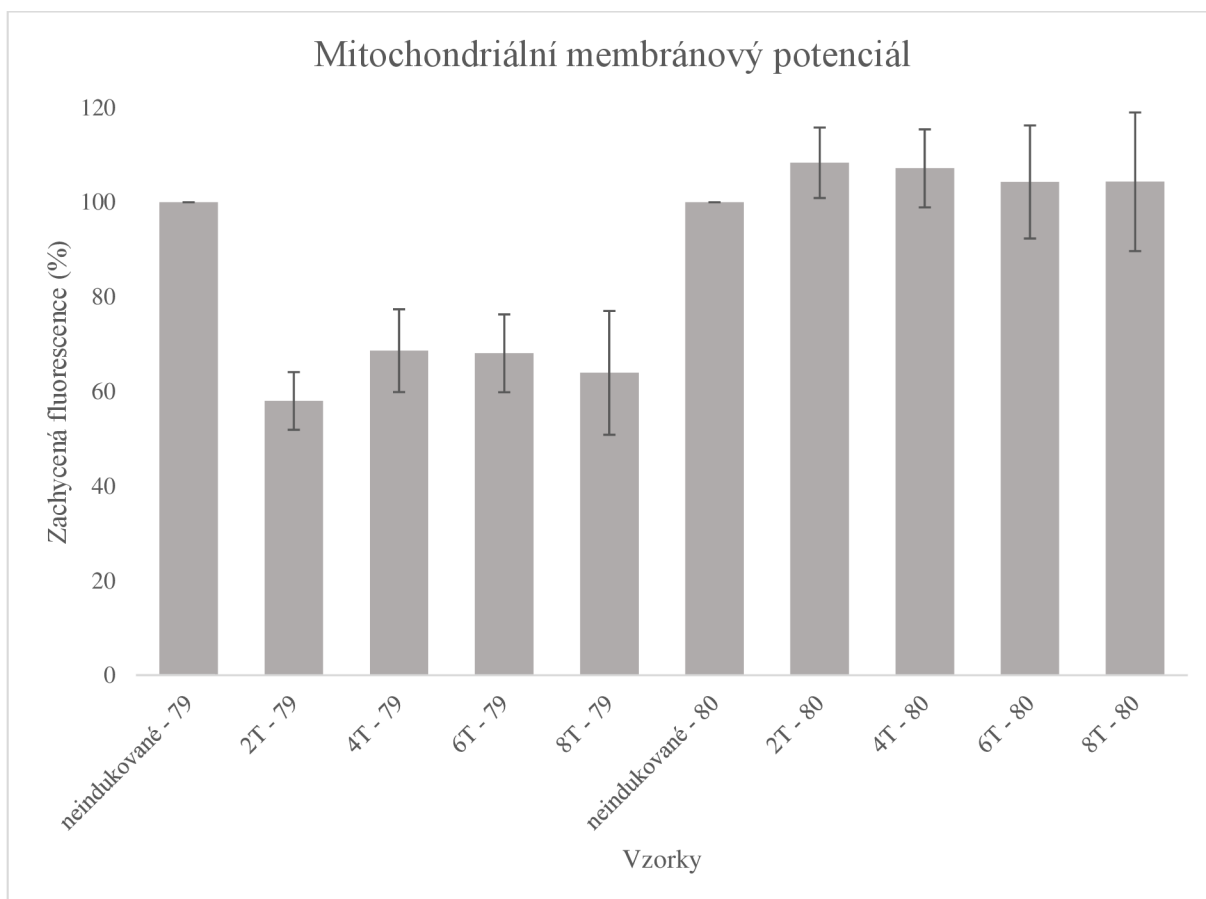
K ověření, zda over-exprese AOX ovlivnila základní funkce mitochondrie, byla použita metoda průtokové cytometrie, pomocí které byly změřeny hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu a množství radikálů kyslíku (mitochondriálních a buněčných).

4.4.1 Mitochondriální membránový potenciál

Overexprese AOX často vede ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu (M. Szibor, et al., 2022). V našem případě ale bylo zjištěno, že v přítomnosti prolinu nedošlo ke snížení průtoku elektronů přes komplexy III a IV (Obrázek 19). Z tohoto důvodu nám přišlo zajímavé zjistit, zda je také ovlivněn mitochondriální membránový potenciál v buňkách *T. brucei* exprimující AOX.

Na obrázku 20 lze vidět graf zachycené fluorescence v procentech (vztaženo k neindukovaným liniím). Během indukce buněk v přítomnosti glukózy došlo k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu, zatímco u buněk s prolinem došlo k lehkému nárůstu (Obrázek 20).

Toto zjištění je velice zajímavé, jelikož to poukazuje na specifické chování AOX za různých podmínek. V přítomnosti glukózy se AOX chová v souladu s literaturou, kdy dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, kdežto za přítomnosti prolinu jsme toto snížení nepozorovali, což odpovídá výsledkům získaným při měření respirace.



Obr. 20: Mitochondriální membránový potenciál. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, 2T – linie indukované 2 dny s tetracyklinem, 4T – linie indukované 4 dny s tetracyklinem, 6T – linie indukované 6 dní s tetracyklinem, 8T – linie indukované 8 dní s tetracyklinem, 79 – inkubační médium SDM 79 + 10 % FBS, 80 – inkubační médium SDM 80 + 10 % FBS.

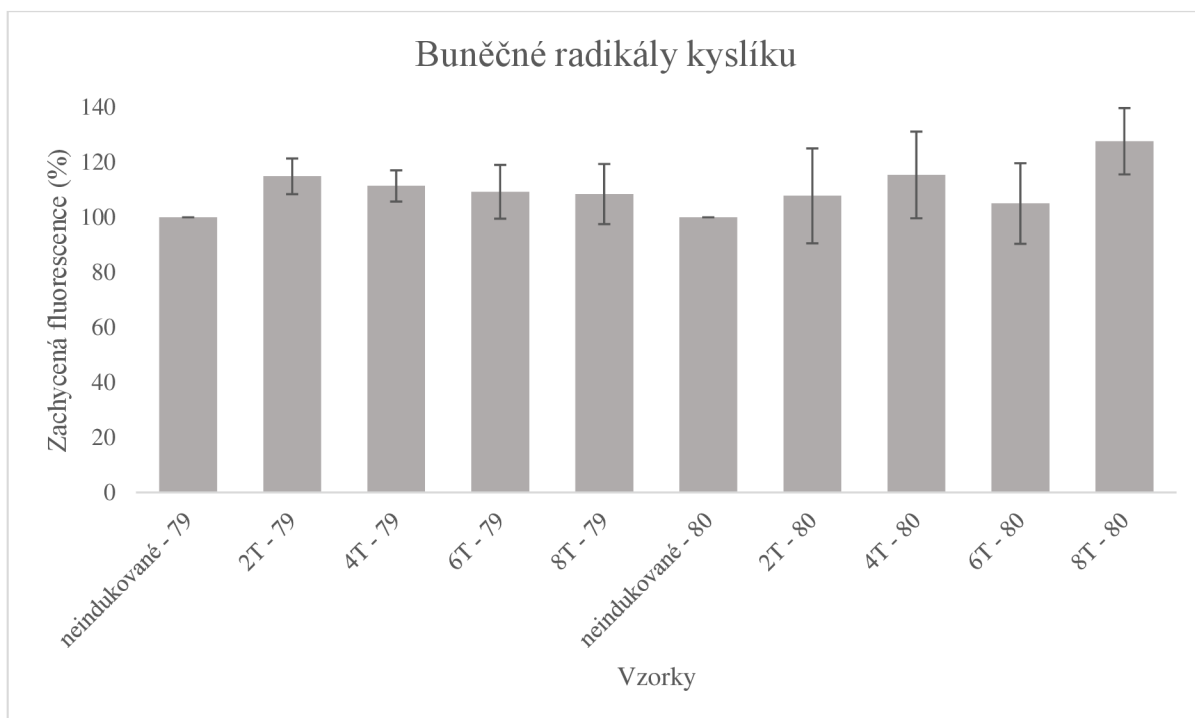
4.4.2 Měření hladiny radikálů kyslíku

V literatuře se uvádí, že exprese AOX může vést ke snížení radikálů kyslíku, jelikož odvádí elektrony od komplexu III, který produkuje radikály kyslíku (M. Szibor, et al., 2022). Proto jsme předpokládali, že u indukovaných linií s tetracyklinem bude menší fluorescence (množství zachycených radikálů kyslíku) než u neindukovaných buněk.

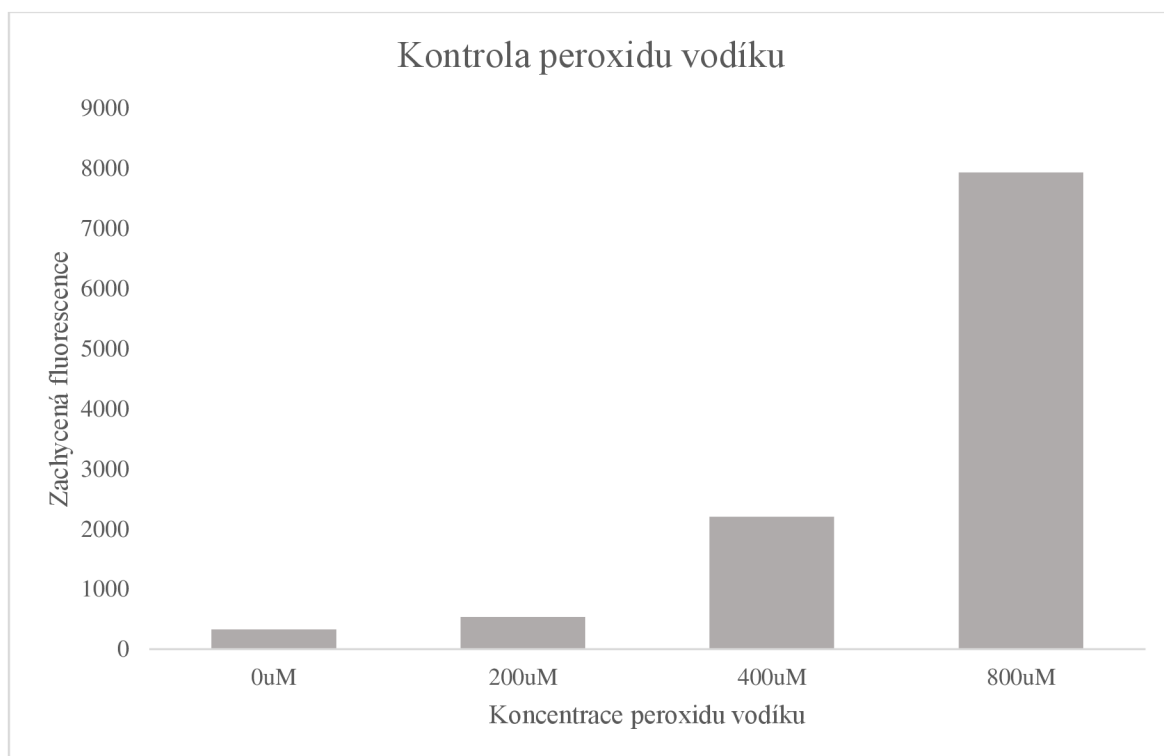
4.4.2.1 Buněčné radikály kyslíku

Buněčné radikály kyslíku byly měřeny pomocí fluorescenční látky DCFH-DA. Na obrázku 21 je vidět množství zachycené fluorescence v procentech (vztaženo k neindukovaným liniím). Během indukce došlo k lehkému nárůstu množství radikálů kyslíku (Obrázek 21), ovšem v rámci chybových úseček tento nárůst není statisticky signifikantní.

Při měření množství buněčných radikálů kyslíku byly použity, jako pozitivní kontrola (která ověřila citlivost měření), buňky, ke kterým byl přidán v různých koncentracích peroxid vodíku. Akumulace peroxidu vodíku vede k oxidačnímu stresu buněk a je pozorován nárůst fluorescence (zvyšování množství radikálů kyslíku) (Obrázek 22).



Obr. 21: Buněčné radikály kyslíku. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, 2T – linie indukované 2 dny s tetracyklinem, 4T – linie indukované 4 dny s tetracyklinem, 6T – linie indukované 6 dní s tetracyklinem, 8T – linie indukované 8 dní s tetracyklinem, 79 – inkubační médium SDM 79 + 10 % FBS, 80 – inkubační médium SDM 80 + 10 % FBS.



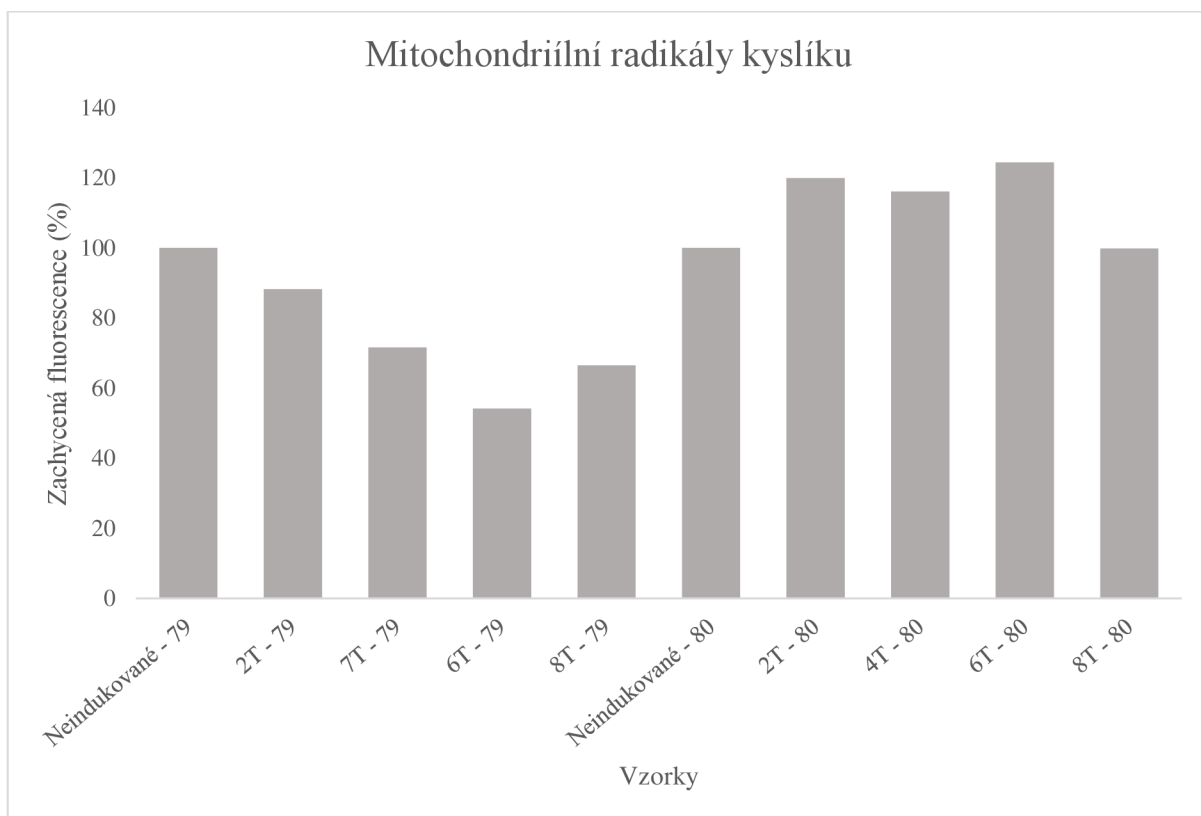
Obr. 22: Kontrola peroxidu vodíku. $0\mu M$ – $0\mu M$ H_2O_2 , $200\mu M$ – $200\mu M$ H_2O_2 , $400\mu M$ – $400\mu M$ H_2O_2 , $800\mu M$ – $800\mu M$ H_2O_2 .

4.4.2.2 Mitochondriální radikály kyslíku – pilotní pokus

Ač nebylo pozorováno snížení radikálů kyslíku na buněčné úrovni, zajímalo nás, zda over-exprese AOX může mít přímý vliv na hladinu mitochondriálních radikálů kyslíku. Tato charakteristika byla měřena pomocí fluorescenční barvy MitoSox. Na obrázku 23 lze vidět zachycenou fluorescenci v procentech (vztaženo k neindukovaným liniím).

Během indukce v přítomnosti glukózy došlo k poklesu mitochondriálních radikálů kyslíku, zatímco u buněk, které rostly v přítomnosti prolinu, došlo k lehkému nárůstu radikálů kyslíku (Obrázek 23). Toto pozorování je v souladu s mými výsledky, kdy v přítomnosti glukózy dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, což naznačuje, že AOX je schopná přebrat elektrony z komplexů III a IV. Tento výsledek bude potřeba potvrdit měřením respirace v přítomnosti glukózy, které je plánované.

Za přítomnosti prolinu došlo k nárůstu mitochondriálních radikálů kyslíku, což odpovídá mým datům, kdy jsme pozorovali zvýšenou respiraci a také mírně zvýšený mitochondriální membránový potenciál.



Obr. 23: Mitochondriální radikály kyslíku. Neindukované – linie, ke kterým nebyl přidáván tetracyklin, 2T – linie indukované 2 dny s tetracyklinem, 4T – linie indukované 4 dny s tetracyklinem, 6T – linie indukované 6 dní s tetracyklinem, 8T – linie indukované 8 dní s tetracyklinem, 79 – inkubační médium SDM 79 + 10 % FBS, 80 – inkubační médium SDM 80 + 10 % FBS.

5 Diskuze

Jedním z hlavních důvodů studia AOX je její schopnost snižovat hladinu radikálů kyslíku, které mohou mít v mitochondriích patofyziologické projevy (Viscomi et al., 2023). Expres AOX, která je u krevní formy trypanozómy jedinou terminální oxidázou, je během jejího životního cyklu regulována. Důležitou roli pravděpodobně hraje během diferenciaci hmyzích forem při programovém remodelingu mitochondriálního metabolismu, protože je spolu s několika málo dalšími enzymy silně up-regulována okamžitě po expresi proteinu RBP6 (RNA binding protein), způsobujícího diferenciaci do metacyklické formy (Doleželová et al., 2020). Proto nás velice zajímalo srovnání změn při spuštění exprese AOX v běžně kultivovaných procyklických buňkách za různých podmínek. Má data poukazují na mírný růstový fenotyp a zvýšení respirace za přítomnosti prolinu zapříčiněné over-expresí AOX. Stojí za povšimnutí, že se v závislosti na použitém médiu lišil efekt over-exprese AOX na mitochondriální membránový potenciál a množství radikálů kyslíku.

5.1 Změna růstu buněčných linií po indukci AOX

Průběh růstových křivek se podobal výsledkům ze studie R. Walker Jr. et al. (2005), ve které měřili růst buněčných linií v médiu s glukózou. V jejich práci uvádí, že buněčná populace indukovaných linií sice rostla pomaleji v porovnání s populací neindukovaných, ale byli názoru, že tento rozdíl je způsobený spíše rozdílností jednotlivých linií než over-expresí alternativní oxidázy. Avšak naše výsledky poukazují na to, že alternativní oxidáza negativně ovlivňuje růst buněčné populace.

To, že over-exprese AOX má vliv na čas, za který dojde ke zdvojnásobení počtu buněk, je velice zajímavé. U buněk, které rostou v přítomnosti glukózy to může být vysvětleno tím, že mají snížený mitochondriální membránový potenciál, a tudíž buňky rostou pomaleji. Snížení membránového potenciálu by mělo vést i k nižšímu množství ATP, které plánuje změřit v další studii. V případě prolinu, kdy se mitochondriální membránový potenciál nesnižuje, musí být růstový fenotyp způsobený něčím jiným. Jednou z možností je, že zde hrají roli zvýšené hladiny mitochondriálních radikálů kyslíku, které jsme detekovali. Aby se ale tato teorie potvrdila, bude potřeba dalšího měření.

5.2 Změna mitochondriálního membránového potenciálu po indukci AOX

Alternativní oxidáza nepřenáší protony (C. Viscomi et al., 2023), proto jsme předpokládali, že vlivem over-exprese alternativní oxidázy dojde k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu. Toto jsme pozorovali u indukovaných buněk s tetracyklinem v médiu s obsahem glukózy (SDM 79). Buňky v médiu SDM 79 vytvářejí své ATP především pomocí glykolýzy a oxidací pyruvátu na acetátu, která je spjata se substrátovou fosforylací (N. Lamour et al., 2005). Zda snížení mitochondriálního membránového potenciálu, také způsobilo snížení množství ATP produkovaného oxidativní fosforylací, však bude potřeba v budoucnu změřit.

Oproti tomu buňky v přítomnosti prolinu jsou plně závislé na produkci ATP přes oxidativní fosforylací, a proto je mitochondriální membránový potenciál velice důležitý (A. Zíková, 2022). Je zajímavé, že v těchto buňkách nedošlo ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, což by napovídalo kompenzačnímu mechanismu, aby se udržel tok elektronů přes proton pumpující komplexy III a IV.

Vlivem over-exprese AOX došlo u indukovaných buněk v médiu s obsahem glukózy k poklesu mitochondriálních radikálů kyslíku (superoxidu). Tento výsledek je v souladu s literaturou (M. Szibor et al., 2022), že AOX snižuje množství vyprodukovaných radikálů kyslíku uvnitř mitochondrie.

Nicméně zajímavý výsledek byl pozorován v médiu s prolinem, ve kterém došlo k lehkému nárůstu mitochondriálních radikálů kyslíku během indukce AOX tetracyklinem. Tento výsledek je v souladu s mými daty, jelikož vidíme nárůst respirace s prolinem a zároveň mírný nárůst mitochondriálního membránového potenciálu. Oxidací prolinu vzniká velké množství redukováných NADH, které musí být reoxidovány, to je u trypanozómy možné pomocí komplexu I a alternativní dehydrogenázy (J. Fang & D. S. Beattie, 2002) (M. Duarte & A. M. Tomás, 2014). Obě tyto dehydrogenázy jsou známým místem tvorby superoxidu, který je následně přetvořen na peroxid vodíku. Je možné, že zvýšená respirace přes prolin právě vede ke vzniku superoxidu. Podobný efekt byl pozorován u *T. brucei* linie, která prochází *in vitro* diferenciací, kdy zvýšená exprese alternativní oxidázy byla doprovázena vzrůstem respirace, což vedlo ke zvýšeným hladinám superoxidu (Doleželová et al., 2020). Proč zároveň nedošlo k nárůstu hladiny buněčných radikálů kyslíku zůstává nezodpovězeno,

ale je možné, že enzymy zodpovědné za detoxifikaci buněčných radikálů kyslíku mají schopnost tuto hladinu držet pod kontrolou.

5.3 Změna buněčného dýchání po indukci AOX

Respirace byla zatím změřena jen u buněk v přítomnosti prolinu. V budoucnu na tento pokus plánujeme navázat a použít glukózu jako substrát.

Výsledky jasně ukazují, že over-exprese AOX ovlivňuje metabolismus prolinu, jelikož dochází ke zdatnému navýšení respirace v přítomnosti prolinu. Jak naznačuje i měření mitochondriálního membránového potenciálu, tak tok elektronů přes komplexy III a IV zůstal stejný, jelikož nedocházelo k poklesu respirace citlivé na KCN. To ukazuje i respirace, kdy navýšená respirace odpovídá proporci pro AOX (respirace citlivá na SHAM). Je možné, že zde dochází ke zvýšenému toku elektronů, jelikož AOX udržuje ubiquinon v redukovaném stavu, což možná zvyšuje aktivitu NADH dehydrogenáz a prolinové dehydrogenázy, a tudíž dochází ke zdatně zvýšené spotřebě prolinu. Také je možné, že dochází ke změnám v genové expresi (například zvýšení exprese prolinového transportéru či enzymů oxidace prolinu), to by bylo ale potřeba ověřit analýzou genové exprese například pomocí metody RNA sekvenování. Pokud by to byla pravda, musela by zde existovat nějaká signální dráha, která by se spustila poté, co by se v mitochondrii objevil nadbytek AOX, poklesl by mitochondriální membránový potenciál a došlo by ke snížení produkce ATP. Toto vše by se mohlo zkombinovat do signálu, kdy by bylo následně potřeba zvýšit spotřebu prolinu, aby se udržel mitochondriální membránový potenciál na stejné úrovni. Tato hypotéza bude v blízké budoucnosti zkoumána v laboratoři.

6 Závěr

V této práci jsme indukovali over-expresi AOX u procyklické formy *T. brucei* a určili jsme jakým, způsobem over-exprese AOX ovlivňuje tuto formu při rozdílné dostupnosti živin (glukóza nebo prolin). Bylo zjištěno, že vlivem over-exprese AOX u buněk v médiu s glukózou došlo ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu a množství mitochondriálních radikálů kyslíku. Zároveň došlo k negativnímu ovlivnění růstového fenotypu. U buněk v médiu s prolinem naopak došlo ke zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu a množství mitochondriálních radikálů kyslíku. Také došlo k negativnímu ovlivnění růstového fenotypu, ale vliv nebyl tak signifikantní jako v případě buněk v médiu s glukózou.

Ve svém budoucím magisterském studiu plánuji s tímto výzkumem pokračovat a rozšířit ho o další experimenty, jako například změření respirace s glukózovým substrátem, produkce ATP substrátovou a oxidativní fosforylací, stanovení poměru NADH/NAD⁺, měření mitochondriálních radikálů kyslíku, měření membránového potenciálu pomocí fluorimetru, či objasnit, zda AOX interaguje specificky s dalšími enzymy (např. glycerol – 3 fosfát dehydrogenázou), což by umožnilo vysvětlit různé fenotypy změřené v médiích s glukózou a prolinem.

7 Seznam použité literatury

- ACHCAR F., KERKHOVEN E. J. & BARRETT M. P. (2014). Trypanosoma brucei: meet the system. *Current Opinion in Microbiology*. 20, 162-169.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. & WALTER P. (2002). Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- BAJGAR A. (2022). PROTOKOL PRAKTICKÁ CVIČENÍ ZE ZÁKLADNÍCH METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE. KMB/608.
- BALOGUN R. A. (1974). Studies on the amino acids of the tsetse fly, *Glossina morsitans*, maintained on *in vitro* and *in vivo* feeding systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 49(2), 215-222.
- BAUER M. F., HOFMANN S., NEUPERT W. & BRUNNER M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends in Cell Biology*. 10(1), 25-31.
- BOCHUD-ALLEMANN N. & SCHNEIDER A. (2002). Mitochondrial Substrate Level Phosphorylation Is Essential for Growth of Procyclic Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry*. 277(36), 32849-32854.
- CLARKSON A. B. Jr., BIENEN E. J., POLLAKIS G. & GRADY R. W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite Trypanosoma brucei brucei is dependent on a plant-like alternative oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 264(30), 17770-17776.
- DOLEŽELOVÁ E., KUNZOVÁ M., DEJUNG M., LEVIN M., PANICUCCI B., REGNAULT C., JANZEN C. J., BARRETT M. P., BUTTER F. & 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), e3000741.
- 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.

- 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.
- FANG J. & BEATTIE D. S. (2003). Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 414(2), 294-302.
- FIGUEIREDO P. A., MOTA M. P., APPELL H. J. & DUARTE J. A. (2008). The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. *Biogerontology*. 9(2), 67-84.
- FUKAI Y., AMINO H., HIRAWAKE H., YABU Y., OHTA N., MINAGAWA N., SAKAJO S., YOSHIMOTO A., NAGAI K., TAKAMIYA S., KOJIMA S. & KITA K. (1999). Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 124(2), 141-148.
- CHAUDHRY R. & VARACALLO M. (2022). *Biochemistry, Glycolysis*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- CHAUDHURI M., OTT R. D. & HILL G. C. (2006). Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology*. 22(10), 484-491.
- CHOUCHANI E. T., PELL V. R., GAUDE E., AKSENTIJEVIĆ D., SUNDIER S. Y., ROBB E. L., LOGAN A., NADTOCHIY S. M., ORD E. N. J., SMITH A. C., EYASSU F., SHIRLEY R., HU C. H., DARE A. J., JAMES A. M., ROGATTI S., HARTEY R. C., EATON S., COSTA A. S. H., BROOKES P. S., DAVIDSON S. M., DUCHEN M. R., SAEB-PARSY K., SHATTOCK M. J., ROBINSON A. J., WORK L. M., FREZZA C., KRIEG T. & MURPHY M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 515(7527), 431-435.
- JACOBS H. T. & BALLARD J. W. O. (2022). What physiological role(s) does the alternative oxidase perform in animals? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1863(6), 148556.

- LAMOUR N., RIVIÈRE L., COUSTOU V., COOMBS G. H., BARRETT M. P. & BRINGAUD F. (2005). Proline Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei* Is Down-regulated in the Presence of Glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 280(12), 11902-11910.
- LANGOUSIS G. & HILL K. L. (2014). Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews Microbiology*. 12(7), 505-518.
- MARTINS-GOMES C. & SILVA A. M. (2018). Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents. *Methods in Molecular Biology*. 1797, 191-203.
- MAZET M., MORAND P., BIRAN M., BOUYSSOU G., COURTOIS P., DAULOUÈDE S., MILLERIOUX Y., FRANCONI J. M., VINCENDEAU P. MOREAU P. & BRINGAUD F. (2013). Revisiting the Central Metabolism of the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the Mitochondrion Is Essential for Parasite Viability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7(12), e2587.
- MENZIES S. K., TULLOCH L. B., FLORENCE G. J. & SMITH T. K. (2018). The trypanosome alternative oxidase: a potential drug target? *Parasitology*. 145(2), 175-183.
- Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II) | Cell Signaling Technology. Cell Signaling Technology (CST): Antibodies, Reagents, Proteomics, Kits and Consumables [online]. Copyright © Mon Apr 10 15 [cit. 10.04.2023]. Dostupné z <https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/mitochondrial-membrane-potential-assay-kit-ii/13296>
- MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicators, for live-cell imaging. [online]. Copyright © Copyright 2006 [cit. 10.04.2023]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008>
- NAGULESWARAN A., FERNANDES P., BEVKAL S., REHMANN R., NICHOLSON P., RODITI I. & MASIGA D. K. (2021). Developmental changes and metabolic reprogramming during establishment of infection and progression of *Trypanosoma brucei brucei* through its insect host. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 15(9), e0009504.

- NOLFI-DONEGAN D., BRAGANZA A. & SHIVA S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 37, 101674.
- NotI | NEB. Reagents For the Life Sciences Industry | NEB [online]. Copyright © Copyright 2023 New England Biolabs. All Rights Reserved. [cit. 10.04.2023]. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/r0189-noti#Product%20Information>
- OOI C. P. & BASTIN P. (2013). More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3, 71.
- PANIGRAHI A. K., ZÍKOVÁ A., DALLEY R. A., ACESTOR N., OGATA Y., ANUPAMA A., MYLER P. J. & STUART K. D. (2008). Mitochondrial Complexes in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 7(3), 534-545.
- ROMERO-MEZA G. & MUGNIER M. R. (2020). *Trypanosoma brucei*. *Trends in Parasitology*. 36(6), 571-572.
- ROSENKRANZ A. R., SCHMALDIENST S., STUHLMEIER K. M., CHEN W., KNAPP W. & ZLABINGER G. J. (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods*. 156(1), 39-45.
- SCIALÒ F., FERNÁNDEZ-AYALA D. J. & SANZ A. (2017). Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*. 8, 428.
- SEED J. R. & WENCK M. A. (2003). Role of the long slender to short stumpy transition in the life cycle of the african trypanosomes. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2, 3.
- SHIBA T., KIDO Y., SAKAMOTO K., INAOKA D. K., TSUGE C., TATSUMI R., TAKAHASHI G., BALOGUN E. O., NARA T., AOKI T., HONMA T., TANAKA A., INOUE M., MATSUOKA S., SAIMOTO H., MOORE A. L., HARADA S. & KITA K. (2013) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(12), 4580-4585.
- SMITH T. K., BRINGAUD F., NOLAN D. P. & FIGUEIREDO L. M. (2017). Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle. *F1000Research*. 6, 683.

- SZIBOR M., SCHENKL C., BARSOTTINI M. R. O., YOUNG L. & MOORE A. L. (2022). Targeting the alternative oxidase (AOX) for human health and food security, a pharmaceutical and agrochemical target or a rescue mechanism? *Biochemical Journal*. 479(12), 1337-1359.
- VANLERBERGHE G. C. & MCINTOSH L. (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48(1), 703-734.
- VISCOMI C., MOORE A. L., ZEVIANI M. & SZIBOR M. (2023). Xenotopic expression of alternative oxidase (AOX) to study mechanisms of mitochondrial disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1864(2), 148947.
- WALKER J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochemical Society Transactions*. 41(1), 1-16.
- WILLIAMS S., SAHA L., SINGHA U. K. & CHAUDHURI M. (2008). Trypanosoma brucei: Differential requirement of membrane potential for import of proteins into mitochondria in two developmental stages. *Experimental Parasitology*. 118(3), 420-433.
- 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.
- YUN J. & FINKEL T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*. 19(5), 757-766.
- ZHOU Q., HU H. & LI Z. (2014). New Insights into the Molecular Mechanisms of Mitosis and Cytokinesis in Trypanosomes. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 308, 127-166.
- ZÍKOVÁ A. (2022). Mitochondrial adaptations throughout the Trypanosoma brucei life cycle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 69(6), e12911.