

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vytvoření geneticky kódovaného nástroje pro produkci
 H_2O_2 molekul uvnitř buněk *Trypanosoma brucei***

Bakalářská práce

Markéta Třísková

Školitel: doc. RNDr. Alena Panicucci Zíková, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Michaela Kunzová

České Budějovice 2024

Bibliografický údaj práce:

Tříšková, M., 2024: Vytvoření geneticky kódovaného nástroje pro produkci H₂O₂ molekul uvnitř buněk *Trypanosoma brucei* [Creation of a genetically encoded tool for the production of H₂O₂ molecules inside *Trypanosoma brucei* cells. Bc. Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This bachelor thesis describes use of D-amino oxidase (DAO) as a tool for the production of intracellular ROS to investigate their role in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. The main objectives were to insert genes for mitochondrial and cytosolic DAO into the genome of *T. brucei*, verify their expression in the respective cellular compartments and induce ROS production with D-alanine. The increased ROS levels were detected with a specific fluorescent dye and by flow cytometry.

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

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. RNDr. Aleně Panicucci Zikové, Ph.D., za poskytnutí veškerých potřebných informací a za nemalou pomoc při psaní této bakalářské práce. Velké poděkování patří také mé konzultantce Mgr. Míše Kunzové, která mi s ochotou pomáhala a byla mi neocenitelnou oporou. Zasloužila si mě do chodu laboratoře a provedla všemi potřebnými metodami. Nemohu opomenout ani přátelský laboratorní tým. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším za jejich neustálou podporu a povzbuzení.

Obsah

1.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	1
1.2	Vznik superoxidu.....	2
1.2.1	Elektronový transportní řetězec (Electron transport chain, ETC)	2
1.2.2	Produkce superoxidu na komplexu I	3
1.2.3	Produkce superoxidu na komplexu III.....	4
1.3	Detoxifikace superoxidu pomocí superoxid dismutázy	5
1.4	Peroxid vodíku (H ₂ O ₂).....	5
1.4.1	Redukce H ₂ O ₂ pomocí enzymů	6
1.5	ROS jako signální molekuly	6
1.5.1	ROS a diferenciaci <i>Trypanosoma brucei</i>	7
1.6	D-amino oxidáza (DAO)	8
2	Cíle práce	11
3	Materiály a metody	12
3.1	Kultivace buněk <i>Trypanosoma brucei</i>	12
3.2	Navržení primerů	12
3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	12
3.4	Elektroforetická analýza	14
3.5	Restrikční analýza.....	15
3.6	Extrakce DNA fragmentů z gelu.....	15
3.7	Ligace inzertu s plazmidem	16
3.8	Transformace plazmidové DNA do bakteriálních buněk.....	17
3.9	Izolace plazmidové DNA.....	17
3.10	Ethanolová precipitace.....	18
3.11	Transfekce plazmidu pHD 13-44 do buněk <i>Trypanosoma brucei</i>	18
3.12	Western blot analýza	19

3.12.1	SDS gelová elektroforéza	19
3.12.2	Přenos proteinů na membránu a jejich vizualizace.....	19
3.13	Digitoninová subcelulární frakcionace	21
3.14	Test cytotoxicity (Alamar blue assay).....	22
3.15	Růstová křivka	23
3.16	Měření produkce buněčných radikálů kyslíku (ROS)	24
4	Výsledky	25
4.1	Zaklonování genu pro DAO do expresního plazmidu	25
4.2	Vytvoření transgenní linie <i>Trypanosoma brucei</i>	28
4.3	Ověření exprese mitochondriální a cytosolické DAO	29
4.4	Verifikace buněčné lokalizace mitochondriální a cytosolické DAO	30
4.5	Kontrola cytotoxicity D-alaninu u buněk <i>Trypanosoma Brucei</i>	31
4.6	Spuštění produkce ROS pomocí D-alaninu	33
5	Diskuze	37
6	Závěr	40
7	Seznam použité literatury	41

1 Úvod

1.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Reaktivními formami kyslíku neboli „ROS“ se zpravidla označují modifikace molekulárního kyslíku, které vznikají v buňce a mají schopnost reagovat s jinými látkami. Jejich rozsah působení je poměrně široký (DNA, RNA, zbytky aminokyselin, proteiny, lipidy) a může zapříčinit patogenní změny v buňkách. Avšak při nízkých koncentracích jsou některé ROS užitečné z hlediska regulace buněčné proliferace, diferenciaci buňky či udržení metabolické homeostázy. ROS můžeme rozdělit do dvou významných skupin, na skupinu s volným radikálem a na neradikálové reaktivní formy (Sies & Jones, 2020).

První zmiňovaná skupina je charakteristická tím, že má jeden nepárový elektron, což ji činí nestabilní a reaktivnější než neradikálové ROS. Řadíme sem například superoxid $O_2^{\cdot -}$, který vzniká přijetím jednoho elektronu kyslíkem. Je poměrně nestálý a neprochází přes membrány. Superoxid je spontánně, anebo katalyticky pomocí superoxid dismutázy přeměněn na H_2O_2 a slouží jako nejvýznamnější zdroj tohoto typu ROS. Může se také účastnit reakcí, které vedou k silně reaktivním formám ROS. Například oxiduje v rámci proteinů železito-sírné klastry (Fe-S) a uvolňuje vysoce reaktivní železo či reaguje s oxidem dusným za vzniku peroxynitritu (Zhang et al., 2019). Další poměrně nebezpečnou formou reaktivního kyslíku je hydroxylový radikál OH^{\cdot} . Vzniká tzv. Fentonovou reakcí, do níž vstupuje iont kovu (např. Fe^{2+}) s peroxidem vodíku (Koppenol & Hider, 2019). Po svém vzniku se nespecificky slučuje s molekulami ve svém okolí a je velmi nestálý. Do této skupiny dále spadají radikály peroxyloxy ROO^{\cdot} , alkoxylový radikál RO^{\cdot} či oxid dusnatý NO^{\cdot} (Zhang et al., 2019).

Neradikálové reaktivní ROS neobsahují volné elektrony, a proto disponují stabilitou s menší reaktivitou. Těmito vlastnostmi se prezentují molekuly jako je například peroxynitrit $ONOO^-$, kyselina hypochloritá $HOCl$ či peroxid vodíku H_2O_2 . Jedná se o molekulu s poměrně dlouhou životností, která je schopná oxidace proteinů obsahující aminokyselinu cystein a vytvoření tzv. disulfidických můstků, jenž mohou změnit strukturu, funkci nebo lokalizaci daného proteinu. Zároveň je schopný difundovat skrz

membrány, a proto je v rámci buňky studován jako možná signální molekula (Zhang et al., 2019).

1.2 Vznik superoxidu

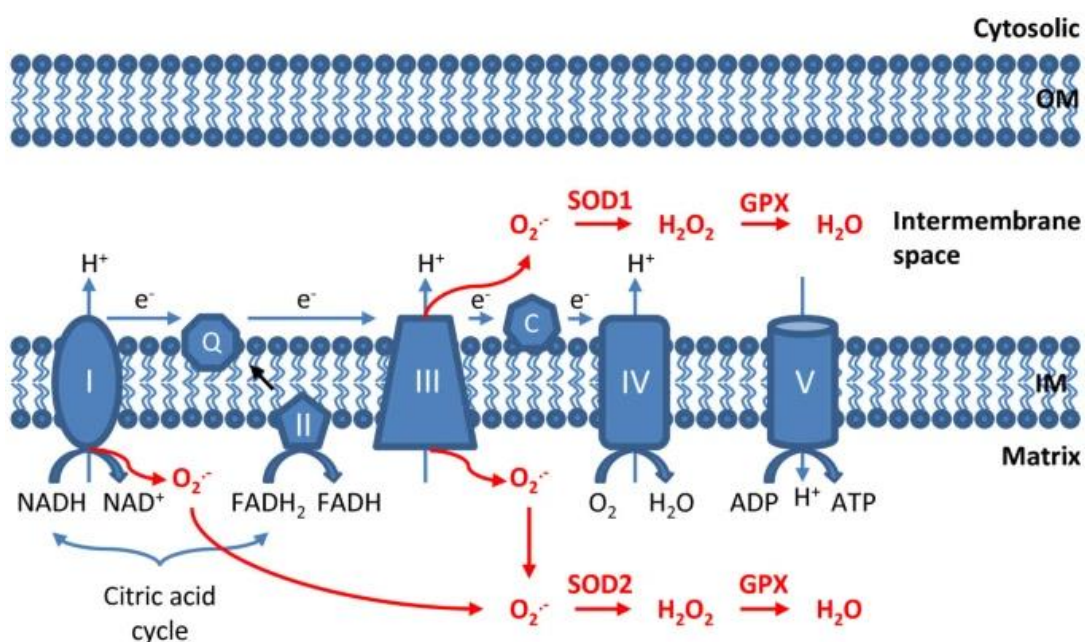
Molekula superoxidu se může v buňce tvořit na různých místech, avšak mitochondrie jakožto organela, kde dochází k buněčnému dýchání, je považována za dominantní místo v produkci této reaktivní molekuly (Adam-Vizi, 2005). Zdroje uvádějí, že v této organelle existuje více než 11 míst, kde můžeme detekovat vznik superoxidu. Nejlépe studované jsou proteinové komplexy elektronového transportního řetězce (Brand, 2016).

1.2.1 Elektronový transportní řetězec (Electron transport chain, ETC)

Elektronový transportní řetězec (electron transport chain, ETC) se nachází na vnitřní membráně mitochondrie a skrze něj procházející elektrony putují až k jejich akceptoru neboli molekule kyslíku (Obr.1). Tomuto procesu se obecně říká buněčné dýchání. ETC je složen ze čtyř proteinových komplexů, jenž umožňují elektronům postupný průchod až ke kyslíku, molekule s nejvyšší afinitou pro elektrony, a tudíž s nejvyšším redoxním potenciálem. Energie, která je při tomto ději postupně uvolňována je využita k „práci“, a to k přečerpání protonů přes vnitřní mitochondriální membrány a vytvoření protonového gradientu. Ten je klíčový pro vznik ATP pomocí F_0F_1 -ATP syntázy, která umožňuje vstup protonů zpět do mitochondriálního matrixu po směru jejich koncentračního gradientu. Celému tomuto procesu se říká oxidativní fosforylace (Sousa et al., 2018).

Elektrony do ETC mohou vstoupit pomocí několika proteinových komplexů či enzymů. Jedna z možností je pomocí přenašeče NADH, který je redukován v matrixu mitochondrie řadou NADH-závislých reakcí. Tento kofaktor se váže na komplex I (NADH: ubichinon oxidoreduktáza), kde je oxidován zpět na NAD^+ . Uvolněné elektrony jsou přeneseny řadou redoxních reakcí komplexu I na koenzym Q (ubichinon), čímž se redukuje na ubichinol. Dalším možným vstupem elektronů do ETC je komplex II (sukcinátdehydrogenáza), který oxiduje sukcinát (meziprodukt Krebsova cyklu) na fumarát, přičemž jsou uvolněné elektrony opět předány ubichinonu. Komplex III (ubichinol: cytochrom *c* oxidoreduktáza) si přebere elektrony z ubichinolu a předá je na jednoelektronový přenašeč cytochrom *c*. Cytochrom *c* je protein ukotvený směrem

do mezimembránového prostoru a funguje jako přenašeč elektronů mezi komplexem III a komplexem IV (cytochrom *c* oxidáza). Ten během oxidace cytochromu *c* přesouvá elektrony na kyslík, který je v této kaskádě konečným akceptorem. Jeho následná redukce dává vzniknout molekulám vody (Zhao et al., 2019).



Obr.1: Schéma elektronového transportního řetězce (ETC), (převzato z Li et al., 2013)

1.2.2 Produkce superoxidu na komplexu I

Hlavními místy produkce ROS v elektronovém transportním řetězci je komplex I a komplex III (Lenaz, 2001). V rámci toku energie na vnitřní membráně mitochondrie jsou ideálně předány čtyři elektrony na O₂, který je tímto způsobem redukován na neškodnou vodu. Může ale dojít k situaci, kdy jsou elektrony během svého toku uvolněny předčasně a dávají tak vzniknout superoxidovému radikálu (únik jednoho elektronu) či peroxidu vodíku (únik dvou elektronů) (Beckman & Ames, 2006). Pokles nebo nárůst produkce ROS závisí na více aspektech, ale obecně lze říci, že zpomalení toku elektronů, zvýšení koncentrace kyslíku nebo jakékoliv mutace v ETC komplexech zapříčiňuje vyšší hodnoty ROS (Brand, 2016).

Na komplexu I se nacházejí pravděpodobně dvě hlavní místa, která jsou spjata s produkcí superoxidu. Jedná se o FMN (flavin mononukleotid), který přichází do styku

s NADH a tuto molekulu oxiduje. Uvolněné elektrony buď pokračují v normálním směru přes redoxní centra komplexu I nebo s pomocí FMN reagují s molekulárním kyslíkem. Vzniklý superoxid je uvolňován do matrixu mitochondrie (Kussmaul & Hirst, 2006).

Za druhé místo produkující superoxidový radikál na komplexu I je považováno vazebné místo pro koenzym Q. To se nachází na vnitřní straně membrány, a proto je i v tomto případě superoxid uvolňován do vnitřního prostředí mitochondrie (Brand, 2016).

1.2.3 Produkce superoxidu na komplexu III

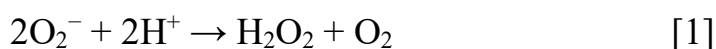
Komplex III je tvořen několika podjednotkami a za ty nejvýznamnější jsou považovány tyto tři: hemový cytochrom *b*, cytochrom *c*₁ a Rieskeho Fe-S protein. Superoxidový radikál je tvořen v Q_o místě, tedy tam, kde probíhá oxidace ubichinolu na ubichinon. Poté co přinese ubichinol na komplex III dva elektrony, je v Q_o místě oxidován a tím se spouští protonmotivní Q-cyklus. Elektrony jsou rozděleny a každý je poslán rozdílnou dráhou. První vstupuje do Rieskeho Fe-S komplexu a přes cytochrom *c*₁ se dostává na přenašeč cytochrom *c*, který dokáže pojmout a přenést jen jeden elektron. Druhý elektron prochází přes cytochrom *b*, obsahující dvě hemové skupiny, do druhého vazebného místa ubichinonu Q_i. Zde tento druhý elektron, který se nepřenáší na komplex IV, redukuje ubichinon za vzniku semichinonu. V tomto bodě přichází na komplex III nová molekula ubichinolu vázající se na Q_o místo. Elektrony jsou opět rozděleny a pokračují každý svou vlastní dráhou v opakujícím se cyklu. Druhý elektron redukuje (společně s dvěma protony z matrixu) již vzniklý semichinon na ubichinol v Q_i místě (Bleier & Dröse, 2013).

Zprvu nebylo jasné, zda se superoxidový radikál tvoří v Q_o či Q_i místě. Proto bylo provedeno několik studií, které pomocí specifických inhibitorů vyhodnotily, že produkce probíhá na Q_o. Například, když byl použit antimycin A k zablokování Q_i místa, došlo k hromadění semichinonu a k následné redukci O₂ na superoxidový radikál. To vedlo k vyšším naměřeným hodnotám tohoto radikálu. V opačném případě bylo inhibováno Q_o místo, např. myxothiazolem, což mělo za následek pokles superoxidu (Muller et al., 2003). Důsledek produkce superoxidu na Q_o místě je v tom, že superoxid (a z toho odvozený H₂O₂), vzniká na straně mezimembránového prostoru. Molekula H₂O₂ může využít poriny nacházející se ve vnější mitochondriální membráně a snadněji proniknout do cytosolu. Tyto

molekuly jsou pak relevantní pro roli ROS jako „druhých poslů“ při buněčné redoxní signalizaci (Bleier & Dröse, 2013).

1.3 Detoxifikace superoxidu pomocí superoxid dismutázy

Superoxid je nestálá molekula s krátkou životností. Buď se samovolně přemění na H₂O₂ nebo je na tuto látku přeměněn pomocí enzymu superoxid dismutáza (SOD) v reakci zvané dismutace (Fridovich, 1997).



Tento enzym se vyskytuje v každé eukaryotní buňce a chrání daný organismus před reaktivními formami kyslíku. V organismech se nachází na vícero místech a pomáhá také regulovat hladiny ROS molekul (Wang et al., 2018).

Součástí superoxid dismutáz jsou přechodné kovy, na základě kterých můžeme tyto enzymy rozdělit do čtyř skupin: FeSOD, MnSOD, Cu,Zn-SOD a NiSOD. První jmenovaný typ superoxid dismutázy nalezneme u eukaryotických buněk v chloroplastech. MnSOD se vyskytuje v mitochondriích a peroxisomech, Cu,Zn-SOD v cytoplasmě a extracelulárním prostoru. NiSOD je nedávno objevená forma u *Streptomyces* (Abreu & Cabelli, 2010).

Aktivita superoxid dismutáz přímo ovlivňuje i signální dráhy v buňce. Reguluje totiž množství peroxidu vodíku, který může sloužit jako signální molekula (Wang et al., 2018).

1.4 Peroxid vodíku (H₂O₂)

H₂O₂ je běžně produkovaná molekula v buňkách a její vznik je pozorován na různých místech. Uvolňuje se například transmembránovými NADPH oxidázami, elektronovým transportním řetězcem, reakcemi v peroxisomech či pomocí superoxid dismutáz. Pokud se jeho koncentrace pohybuje ve fyziologických hodnotách, nepředstavuje riziko a je pro svou stabilitu a schopnost difundovat skrz membrány, využíván jako signální molekula v redoxní signalizaci. H₂O₂ reaguje nejčastěji s cysteiny ve specifických bílkovinách, u kterých oxiduje thiolát (S⁻) na sulfenát (SO⁻) nebo dokonce na disulfid (S-S). To má za následek

změnu aktivity, funkce, struktury nebo lokalizace proteinu, což spouští další buněčné procesy (diferenciaci, proliferaci atd.). Tyto signální dráhy jsou poměrně vysoce specifické, jelikož rychlost reakce závisí na konkrétní bílkovině a prostředí. To poskytuje základ pro selektivitu H_2O_2 v redoxní signalizaci. V případě nadprodukce této ROS molekuly může oxidací docházet k nezvratnému poškození proteinů a lipidů, což může vést až k buněčné smrti (Sies & Jones, 2020).

1.4.1 Redukce H_2O_2 pomocí enzymů

Buňka si vyvinula obranné mechanismy, aby mohla v případě potřeby eliminovat H_2O_2 . Jedná se o speciální enzymy s katalytickou funkcí. Patří sem například kataláza, která je přítomná v téměř všech aerobních organismech a dokáže rozložit dvě molekuly H_2O_2 na jeden kyslík a dvě vody (Nandi et al., 2019). Dalším důležitým enzymem s antioxidačními schopnostmi je glutathion peroxidáza. Její úlohou je redukovat peroxid vodíku a hydroperoxydy lipidů. Je charakterizována jako peroxidáza vyskytující se v cytoplazmě a v mitochondriích, pro kterou je typická přítomnost aminokyseliny selenocystein (Handy & Loscalzo, 2022). H_2O_2 nemusí být peroxidázami redukován jen na neškodné molekuly. Pro některé enzymy, jako je například myeloperoxidáza, je zdrojem pro syntézu sloučenin, které pak buňka využívá při obraně proti patogenům. Dalším typem detoxifikačních enzymů jsou tzv. peroxiredoxiny (Winterbourn et al., 2016).

1.5 ROS jako signální molekuly

Velké množství dějů probíhajících v buňkách je ovlivňováno redoxní signalizací, ve které figurují ROS molekuly. Jednotlivé signální dráhy pak vytvářejí složité sítě. Ty jsou často navzájem propojeny a mají širokou škálu působení (Forrester et al., 2018). Jak již bylo řečeno výše, redoxní signalizace převážně působí na proteiny/enzymy. Jejich oxidací může dojít ke změně aktivity či funkce, což spouští celou kaskádu reakcí. Například bylo zjištěno, že ROS molekuly ovlivňují oligomerizaci peroxiredoxinu II, jenž se účastní regulace replikace DNA. Při nízkých hodnotách ROS se nachází peroxiredoxin II v oligomerické formě a váže se na protein Timeless urychlující replikační vidlici. Pokud však dojde k nárůstu koncentrace ROS, peroxiredoxin II se díky svému zvýšenému oxidačnímu statusu nemůže sbalit do oligomeru. Oddálí se tedy od chromatinu a tím způsobí disociaci proteinu Timeless. Následně dojde ke zpomalení replikační vidlice, což

má vliv na celkový proces replikace (Somyajit et al., 2017). Dalším příkladem popisujícím účinky ROS na své okolí, je oxidace glykolytického enzymu glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH). Při vyšších koncentracích ROS mění oxidovaná forma GAPDH svou lokalizaci z cytosolu do jádra, kde se podílí na opravě DNA (Sirover, 2018). Redoxní signalizace je důležitá i v regulaci iontových kanálů na plazmatické membráně či jako odezva na nadbytek nebo nedostatek živin (Sahoo et al., 2014). ROS mohou mít významný vliv i na mitochondrie, zejména prostřednictvím oxidace enzymů obsahující Fe-S klastry. Superoxidový radikál je k těmto proteinům silně přitahován a může způsobit změnu aktivity komplexů, jenž mají tyto klastry ve své struktuře. Jelikož se jedná o komplexy I, II a III dýchacího řetězce, mají ROS efekt na aktivitu ETC a s ním spojenou oxidativní fosforylaci (Sies & Jones, 2020). ROS hrají roli i v tzv. retrogradní signalizaci, při které dochází k informování jádra o stavu mitochondrie přímo z této organely. Tento typ signalizace může vést až ke změně typu buňky, či jejího případného odstranění apoptózou (Frank et al., 2012).

1.5.1 ROS a diferenciacie *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je jednobuněčný parazit, který postihuje savce, včetně člověka. Vyskytuje se převážně v oblasti subsaharské Afriky a jeho přenašečem je moucha tse-tse. V rámci svého životního cyklu tedy střídá savčího a hmyzího hostitele. Cyklus začíná, když moucha tse-tse nasaje krev z infikovaného jedince. Prvok se tak dostává do jejich střev, kde zůstává po určitou dobu v tzv. procyklické formě (PCF). Následuje stádium epimastigota (EMF) a jeho přesun z trávicího ústrojí směrem do epitelu slinných žláz. Jakmile prvok obsadí slinné žlázy mouchy, přechází do metacyklického infekčního stádia a při dalším bodnutí je, společně s obsahem slinných žláz, vpraven do krevního oběhu hostitele. Zde se diferencuje do dalšího vývojového stádia tzv. krevní formy (bloodstream form, BSF). Během tohoto složitého cyklu je parazit konfrontován velice rozdílným prostředím (krevní oběh savce versus střevo mouchy), které se liší svým chemickým složením, teplotou a pH. Parazit se dokáže těmto různým podmínkám přizpůsobit a z toho důvodu se jeho jednotlivá stádia od sebe navzájem liší například genovou expresí, metabolismem a celkovou stavbou buňky (Ponte-Sucre, 2016).

T. brucei obsahuje pouze jednu mitochondrii, která prochází při buněčné diferenciaci parazita výraznou změnou jak ve své struktuře, tak v metabolismu (Zíková, 2022).

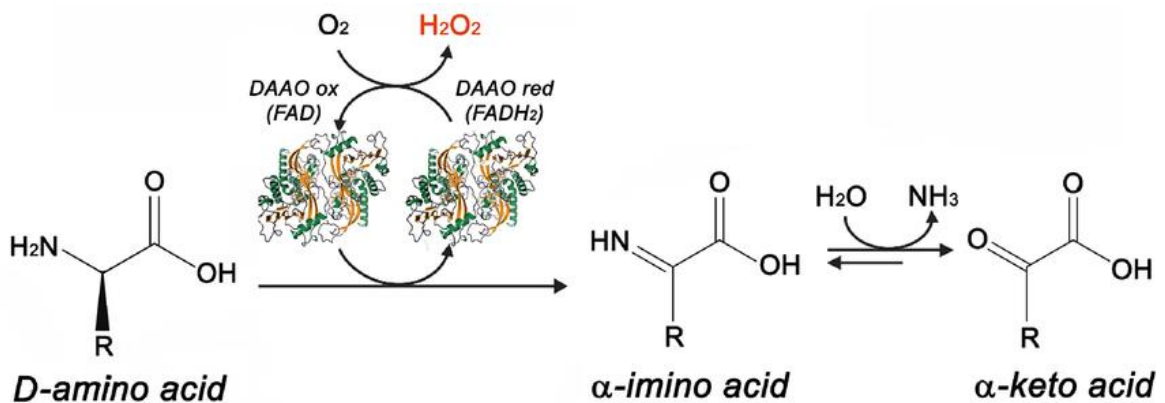
Pro hmyzí stádia je typická mitochondrie retikulovaná a metabolicky aktivní. Oproti tomu mitochondrie savčí formy je tubulární a metabolicky méně aktivní. Jak k těmto změnám dochází a co je spouští a řídí je otázkou aktuálního výzkumu. Cestu k tomuto výzkumu otevřela možnost provést buněčnou diferenciaci trypanozóm v kultuře, a to pomocí řízené indukce exprese RNA binding proteinu 6 (Kolev et al., 2012). Indukce tohoto proteinu spustí v buňce trypanozóm diferenciaci z procyklického stádia přes epimastigotní až k infekčním metacyklikům připraveným pro vstup do savčího hostitele. Naše laboratoř při studiu této diferenciaci ukázala, že změny v aktivitě mitochondrie jsou doprovázeny produkcí ROS molekul, které slouží jako signály řídící buněčnou diferenciaci (Doleželová et al., 2020). Zatím ale není jasné, jak je signál přenášen z mitochondrie do zbytku buňky a jakým způsobem mitochondriální ROS ovlivňují diferenciaci trypanosom. K řešení tohoto problému by mohl sloužit systém založený na řízené produkci H_2O_2 v části buňky či organely, kterou si sami zvolíme. Cílené produkce H_2O_2 molekul lze dosáhnout pomocí enzymu D-amino oxidáza, který se za normálních okolností v buňce trypanozóm nevyskytuje a který po přidání D-amino kyselin (např. D-alaninu) řízeně produkuje H_2O_2 (Waldeck-Weiermair et al., 2021).

1.6 D-amino oxidáza (DAO)

Oxidáza D-aminokyselin (DAAO) je flavoenzym obsahující FAD (Flavin adenin dinukleotid), který s absolutní stereoselektivitou katalyzuje oxidativní deaminaci všech přírodních D-aminokyselin (Ferenčík & Škárka, 2000; Waldeck-Weiermair et al., 2021).

Studie ukázaly, že se tento enzym vyskytuje, vyjma rostlin, u většiny eukaryotických organismů (Pollegioni et al., 2007). Fyziologická úloha enzymu byla dlouho diskutována, zejména proto, že hladiny D-aminokyselin byly sotva zjistitelné a jejich přítomnost v mnoha tkáních byla zpochybňována. Avšak díky zdokonaleným analytickým metodám byly detekovány hladiny D-aminokyselin, a to otevřelo cestu k identifikaci specifických fyziologických rolí D-aminokyselin a k návrhu klíčové role DAAO v řízení buněčného metabolismu (Fuchs et al., 2005).

DAO katalyzuje oxidaci D-aminokyselin na α -ketokyseliny a současně je z reakce uvolňován amoniak a H_2O_2 . FAD působí u tohoto enzymu jako kofaktor a je tedy klíčový pro aktivaci jeho funkce (Obr.2) (Waldeck-Weiermair et al., 2021).



Obr. 2: Oxidační deaminace D-aminokyseliny enzymem DAO (Boreggio et al., 2022)

DAO se dá využít i v genetickém inženýrství, kdy je možné vytvořit buněčnou linii exprimující vysoké hladiny tohoto enzymu. Po přidání D-aminokyseliny se může spustit řízená produkce H_2O_2 . Tento výjimečný nástroj byl již využit i v několika studiích pro produkci H_2O_2 v buňkách. Příkladem může být zkoumání fosforylačních drah ve vaskulárních endoteliálních buňkách a jejich reakce na H_2O_2 . V buňkách byly porovnávány signální odpovědi, když byl H_2O_2 přidáván zvnějšku, anebo když byl produkován samotnou buňkou pomocí DAO zacílené do cytosolu a jádra. Pozornost byla převážně soustředěna na známé proteiny kinázy Akt, AMPK a eNOS, které jsou součástí fosforylační signální dráhy a reagují na signální molekuly typu H_2O_2 . Aktivita kináz se lišila podle toho, zda byl H_2O_2 přidáván exogenně do kultury či produkován endogenně v buňce pomocí DAO (Saeedi Saravi et al., 2020).

V další studii se zabývali otázkou ohledně prostupnosti H_2O_2 přes mitochondriální membránu. I když je H_2O_2 membránou prostupný, není jisté, zda H_2O_2 vytvořený v mitochondriální matrix, je schopen tuto organelu opustit a ovlivnit proteiny v cytosolu. Během experimentů byla DAO v savčích buňkách zacílená do mitochondriální matrix a do mitochondriálního mezibuněčného prostoru. K detekci případných unikajících molekul H_2O_2 z mitochondrie sloužila fluorescenční sonda HyPer7 umístěna v cytosolu. Po aktivaci DAO v matrix mitochondrie pomocí substrátu D-alaninu nebyl v cytosolu zaznamenán žádný signál. Signál byl zachycen pouze v případě, kdy byla snížena detoxifikační schopnost mitochondrie. Z toho vyplývá, že H_2O_2 molekuly mohou prostoupit přes vnitřní mitochondriální membránu, ale zda to udělají záleží na schopnosti

organely tyto molekuly odbourávat. Tudíž reakce ovlivňuje rovnováha mezi produkcí a odbouráváním ROS, a to je cesta, kterou buňka může zvolit v případě využití ROS jako signálních molekul (Pak et al., 2020).

V této práci jsme se rozhodli zavést DAO do buněk *Trypanosoma brucei* za účelem kontrolované produkce H_2O_2 v mitochondrii a cytosolu. Hlavním cílem pozorování bude vliv mitochondriálních a cytosolických ROS na buněčnou diferenciaci trypanosom u parentálních linií (29-13) a posléze u buněk s indukovanou expresí RNA binding proteinu 6, tedy u těch, které procházejí diferenciací (Doleželová et al., 2020).

2 Cíle práce

- Zaklonovat DAO do expresního plazmidu pHD 13-44
- Vytvořit transgenní linii *T. brucei* s možností spustit indukci exprese cytosolické a mitochondriální DAO
- Ověřit expresi obou forem DAO
- Indukovat produkci ROS pomocí D-alaninu

3 Materiály a metody

3.1 Kultivace buněk *Trypanosoma brucei*

Buňky byly uchovávány v bezglukózovém médiu SDM-80 s 10% FBS (fetální hovězí sérum), ke kterému byl přidáván N-Acetyl-D-glucosamine (Sigma #A3286), jehož schopností je blokovat transport zbývající glukózy z FBS do vnitřního prostředí buněk. K parentální linii 29-13 byla přidávána antibiotika geneticin G-418 (22 μ M) a hygromycin (44 μ M). K linii RBP6, ve které jsme schopni spustit buněčnou diferenciaci pomocí indukce exprese RBP6, byl navíc, kromě již zmíněných, přidáván phleomycin (1,65 μ M).

3.2 Navržení primerů

Designování a zhotovení primerů probíhalo v programu Geneious. Celkově byly navrženy dva typy forward primerů a jeden reverse primer pro zacílení DAO do mitochondrie a cytosolu. Součástí všech primerů byla homologní sekvence k původnímu plazmidu. Za homologní sekvenci byla přidána restrikční místa BamHI a HindIII z důvodu plánovaného klonování do plazmidu pHD13-44. Restrikční enzymy byly schopné v těchto místech DNA specificky nastříhnout. Forward primer pro DAO s lokalizací do mitochondrie měl navíc ISCU sekvenci, která je používána, jako targetovací sekvence do mitochondrie (Mach et al., 2013). Do reverse primeru byl přidán tzv. FLAG - tag, sekvence nukleotidů kódující krátký peptid, jenž slouží k imunodetekci proteinů pomocí komerční protilátky (blíže popsáno v kapitole Western Blot analýza). V rámci všech primerů byly na 5'konec přidány tři náhodné nukleotidy, které usnadnily nasednutí restrikčních enzymů na specifické místo.

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)


Sekvence pro D-amino oxidázu byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce. Jako templát DNA sloužil kodón-optimalizovaný plazmid pUC57 DAO. Do reakční směsi byla dále přidána termostabilní AccuPrimeTM Taq DNA polymeráza, 10 \times AccuPrimeTM PCR pufr I a poslední složku představovaly reverse a forward primery, viz tabulka č. I.

Tab. I: Primery použité při PCR reakci

Název primeru	Kód primeru
Reverse	AZ1677
Fw mitochondrie	AZ1676
Fw cytosol	AZ1675

Primery se přichytily na DNA na základě komplementarity, umožnily nasednou Taq DNA polymeráze na vlákno a zároveň vymezily úsek, jenž byl pomocí PCR namnožen. Kvůli nutnosti oddělit forward primer s lokalizací do mitochondrie, forward primer s lokalizací do cytosolu a vzorek pro kontrolu, byly jednotlivé reakce s celkovým objemem 50 μ l napipetovány do tří zkumavek. Pro přehlednější jsou všechny reakční směsi a objemy jednotlivých složek uvedeny v tabulce č. II.

Tab. II: Složení a objemy PCR reakcí

Složka	Negativní vzorek	mt_DAO	cyt_DAO
Mili – Q voda	41 μ l	38,2 μ l	38,2 μ l
10 x Puf r I	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Reverse primer (10mM)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Fw primer (10mM)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
AccuPrime™ Taq DNA polymeráza	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Templát		2,8 μ l	2,8 μ l

PCR reakce probíhala v přístroji termocykler, u kterého je možné zvolit optimální teploty pro denaturaci, nasednutí primerů a syntézu DNA. Nejprve byly nastaveny hodnoty pro počáteční denaturaci na 94 °C a 2 minuty. Následoval krok samotné denaturace, při které se dvoušroubovice díky vysokým teplotám rozvolnila na jednořetězcová vlákna

a umožnila tak v dalším kroku při nižších teplotách nasednout primerům. Díky nim mohla DNA polymeráza, při opětovném zvýšení teplot, započít syntézu DNA. Hodnoty, které byly nastaveny pro jednotlivé fáze jsou uvedeny v tabulce č. III.

Tab. III: Hodnoty nastavené na termocykleru

Fáze	Čas	Teplota
Denaturace	30 sekund	94 °C
Nasednutí primerů	30 sekund	58 °C
Extenze	1 min. 20 sekund	68 °C

Pro dostatečné namnožení sekvence D-amino oxidázy prošly tyto tři fáze 35 cykly. Úplné dokončení PCR reakce proběhlo během terminální extenze v 5 minutách při 68 °C. Pomocí elektroforetické analýzy byla ověřena úspěšnost PCR reakce.

Vzorky z PCR reakce byly přečištěny pomocí GenElute PCR Clean-up kitu a to následujícím postupem. Kolonka zachytávající DNA byla promyta 500 µl Column Preparation Solution. Dále byl připraven roztok smícháním 250 µl Binding Solution a 50 µl PCR reakce (1objem PCR reakce na 5 objemů Binding solution), který byl přesunut na kolonku a centrifugován. Přidáním 500 µl Wash Solution a opětovnou centrifugací byla DNA zbavena případných nečistot. Po těchto krocích byla kolonka se zachycenou DNA přemístěna do nové zkumavky a pomocí 50 µl Elution Solution (65 °C) vymyta. Čistota a koncentrace DNA roztoku byla měřena na spektrofotometru Nanodrop.

3.4 Elektroforetická analýza

V prvním kroku byl připraven 1% agarózový gel rozpuštěním 0,8g agarózy v 80 ml TAE pufru (40 mM Tris ultrapure, 20 mM kyselina octová, 2 mM EDTA). Poté bylo přidáno 1,5 µl ethidium bromidu (394,3 g/mol), který umožnil pozdější vizualizaci vzorků. Na ztuhlý gel byl napipetován marker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) a požadované množství vzorků s míchaných s nanášecím pufrem 10× DNA loading dye (Mili-Q voda, glycerol 39%, SDS 0,5%, EDTA 10 mM, 0,1% xylene cyanol). Elektroforetická vana byla zapojena do zdroje, tak aby vzorky ležely blíže ke katodě a mohly migrovat směrem

ke kladnému náboji, tedy k anodě. Přístroj byl nastaven na 90 V, 40 minut. Po uběhnutí daného času, byly vzorky vizualizovány na ChemiDoc (BIO-RAD).

3.5 Restrikční analýza

Nukleové kyseliny mohou být štěpeny pomocí restrikčních enzymů. Všechny typy těchto enzymů fungují na podobném mechanismu rozpoznávající krátkou sekvenci nukleotidů. Většinou se jedná o palindromickou sekvenci a pokud na takovou narazí, začnou v tomto místě štěpit fosfodiesterovou vazbu. V této práci byly využity enzymy HindIII a BamHI za účelem zaklonování mt_DAO a cyt_DAO do pHD 13-44 plazmidu. Dále byl použit enzym NotI, který rozstříhl finální plazmid pHD 13-44 se zaklonovanou mt_DAO a cyt_DAO ve specifickém místě a ten mohl být posléze v linearizované podobě začleněn do genetické informace *Trypanosoma brucei*.

Komponenty potřebné k restrikční reakci (restrikční enzym, pufr, plazmidová DNA a Mili-Q voda) byly smíchány ve zkumavce a ponechány po určitou dobu (záleželo na experimentu) v nahřívacím bloku při 37 °C.

Do reakce plazmidu pHD 13-44 s mt_DAO fragmentem byly přidány 2 µl enzymu NotI, 25 µl 10 × FD pufru, 130 µl plazmidové DNA (362 ng/µl) a 93 µl Mili-Q vody. Pro druhou reakci plazmidu pHD 13-44 s cyt_DAO fragmentem byly smíchány 2 µl enzymu NotI, 25 µl 10 × FD pufru, 120 µl plazmidové DNA (375 ng/µl) a 103 µl Mili-Q vody. U obou reakcí byl celkový objem 250 µl.

3.6 Extrakce DNA fragmentů z gelu

Po nanesení střížených vzorků na gel a spuštění elektroforetické analýzy byly sledované vzorky rozděleny podle velikosti. Poté došlo k vizualizaci fragmentů pomocí UV záření, vyříznutí z gelu a následně přečištění gelu.

Celkově byly z gelu vyříznuty tři vzorky (linearizovaný plazmid pHD 13-44, fragmenty pro cyt_DAO a mt_DAO), ke kterým byl přidán solubilizační roztok podle následujících rovnic:

$$\text{Váha gelu [mg]} * 3 = x \text{ µl solubilizačního roztoku} \quad [2]$$

$$\text{pHD 13-44: } 79 \text{ mg} * 3 = 237 \text{ µl solubilizačního roztoku}$$

cyt_DAO: 159 mg * 3 = 477 µl solubilizačního roztoku

mt_DAO: 184 mg * 3 = 552 µl solubilizačního roztoku

Zatímco se vzorky inkubovaly (10 minut, 55 °C), byly připraveny 500 µl Preparation Solution kolonky pro navázání DNA. Když byl gel řádně rozpuštěn, přidalo se do směsi takové množství isopropanolu, jaká byla samotná hmotnost gelu. Přemístěním vzorků na kolonky a stočením po dobu 1 minuty, 12 000 x g bylo dosaženo navázání DNA na filtr. Poté se pokračovalo s promytím pomocí 700 µl Wash Solution a přemístěním kolonek do nových zkumavek, kam bylo přidáno 50 µl elučního roztoku (65 °C). Po stočení byla měřena čistota a koncentrace vzorků na přístroji Nanodrop.

3.7 Ligace inzertu s plazmidem

Do reakce byl přidán vektor (plazmid pHD 13-44) o délce 5060 bp, linearizovaný enzymy BamHI a HindIII, s inzerty pro cyt_DAO o délce 1132 bp nebo mt_DAO o velikosti 1207 bp. Do reakce bylo přidáno takové množství inzertu a vektoru, aby byl dodržen molární poměr inzert ku vektoru 3:1. Jednotlivé komponenty použité v reakci jsou pro zřehlednění uvedeny v tabulce č.IV.

Tab. IV: Jednotlivé komponenty v ligační reakci

Složka	pHD 13-44 + mt_DAO	pHD 13-44 + cyt_DAO
Vektor	3 µl	3 µl
Inzert	1,8 µl	2,7 µl
10 × ligační pufr	1 µl	1 µl
DNA ligáza	1 µl	1 µl
miliQ	3,2 µl	2,3 µl

3.8 Transformace plazmidové DNA do bakteriálních buněk

Tato metoda využívá možnosti vložení plazmidu do bakterií a současně rychlého namnožení tohoto insertu. K 50 μl kompetentních buněk *Escherichia coli* XL-1 blue byly přidány 3 μl ligační směsi. Následovala inkubace na ledě (10-20 minut) a vložení vzorků do tepelného bločku nastaveného na 42 °C, 45 sekund. Po tepelném šoku byly buňky přesunuty na 2 minuty na led a bylo přidáno 250 μl SOC média (0,5% výtažek z kvasinek; 2% trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 20 mM glukóza). V této podobě byly buňky inkubovány 45 minut při 37 °C. Poté byl celý objem (300 μl) rozprostřen na Petriho misku (agarová plotna s ampicilinem 270 μM) a ponechán 12-16 hodin v třepacím inkubátoru. Z narostlých kolonií byly vybrány ty nejvíce osamocené, s kterými byla provedena izolace plazmidové DNA.

3.9 Izolace plazmidové DNA

Pro úspěšné získání plazmidové DNA z bakterií *E. coli* a zabránění kontaminace bylo důležité pracovat co nejrychleji jen se sterilními nástroji a v blízkosti kahanu. Do zkumavek byly napipetovány 3 ml LB média (1% trypton, 1% NaCl, 0,5% kvasný extrakt), které slouží jako ideální roztok pro růst bakterií. K němu bylo přidáno antibiotikum ampicilin (270 μM , ředěno 1: 1000). Sterilní špičkou byl odebrán vzorek z předem vybrané kolonie bakterií. Kultivace bakterií v LB médiu probíhala v rozmezí 14-16 hodin. Následně byla provedena izolace plazmidové DNA s využitím miniprep kitu (GenElute™ Plasmid Miniprep kit).

Obsah zkumavky (3 ml) byl stočen na 12 000 x g, 1 minutu, 25 °C a vzniklý pelet byl rozpuštěn v 200 μl resuspendačního roztoku. Poté byl přidán lyzační roztok 200 μl , po doporučené době působení (optimum 3 minuty) neutralizační pufr 350 μl a nakonec bylo vše stočeno na 1200 g x, 10 minut. Na kolonku přečištěnou 500 μl Column Preparation Solution byl napipetován supernatant, a aby došlo k oddělení tekuté a pevné složky, byl vzorek centrifugován. Pomocí Wash solution 1 a Wash solution 2 byly zachycené plazmidy promyty a následně přemístěny do nové zkumavky. V konečném kroku byla zkumavka po přidání 50 μl Elution Solution stočena na 12 000 x g, 1 minutu při 25 °C. U takto zhotovených vzorků proběhlo měření koncentrace pomocí spektrofotometru Nanodrop.

3.10 Ethanolová precipitace

Pomocí ethanolu byl přečištěn linearizovaný plazmid pHD13-44 s fragmentem cyt_DAO nebo mt_DAO. K vzorkům byl přidán 3 M NaOAc (0,2 V ze vzorku), pH= 5. Poté 2 V vychlazeného 96% ethanolu a následně byla směs přemístěna na 30 minut do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynulé době bylo vše stočeno na maximum otáček při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 minut. Vzniklý pelet byl resuspendován v 70% vychlazeném ethanolu a nechal se opět točit v centrifuze na maximum otáček, 15 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zbývalo už jen odsát veškerý supernatant, vysušit pelet pouhým otevřením víčka zkumavky po dobu 15-30 minut

3.11 Transfekce plazmidu pHD 13-44 do buněk *Trypanosoma brucei*

V této metodě bylo manipulováno s DNA v linearizované podobě, aby mohla být snáze začleněna pomocí homologní rekombinace do genomu *Trypanosoma brucei*.

Celkem bylo odebráno 1×10^8 buněk *T. brucei*, které byly po přenesení do sterilních zkumavek stočeny na 1300 g x, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minut. Pelet byl promyt v 10 ml vychlazeného PBS-G (1x 10 x PBS, 6mM glukóza, miliQ) a centrifugován 10 minut, 1300 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V mezičase bylo připraveno 100 μl AMAXA Human T-cell roztoku smícháním 81,8 μl Human T-cell nucleofactor a 18,2 μl Supplement. Pelet buněk byl v tomto roztoku resuspendován a celý objem (100 μl) byl přidán k naštípané a přečištěné plazmidové DNA (10-12 ug) v kyvetě. Samotná elektroporace proběhla v AMAXA přístroji nastaveném na program X-014. Buňky byly v rámci krátkého časového intervalu vystaveny elektrickému napětí, během kterého došlo k větší propustnosti membrán a vtažení cizorodé DNA (plazmidu) dovnitř buňky. Následně byl obsah kyvety resuspendován v 6 ml média (SDM-80 + 10% FBS) bez antibiotik a inkubován 16-18 hodin. Po uplynulé době bylo k inkubovaným buňkám přidáno dalších 6 ml média se selekčním antibiotikem (Puromycin 2 μM) s 2 x vyšší koncentrací. Poté byly buňky daným postupem přeneseny na 24 jamkovou destičku, kde probíhala jejich kultivace. Do prvních čtyř jamek v A řádku byly přidány 2 ml média s buňkami po transfekci. Do B, C, D řádků bylo přidáno médium SDM 80 + 10% FBS s danými antibiotiky a to takovým způsobem, že v B, C řádku bylo celkově 1,5 ml a v D řádku 1 ml média. V dalším kroku bylo přeneseno 0,5 ml z A jamky do B. Po pečlivém promíchání bylo opětovně odebráno a přeneseno stejné množství do následujícího řádku. Tímto principem byl napipetován zbytek destičky. V rámci čtyř

sloupců došlo tedy k postupnému ředění takovým způsobem, že v A řádku byly buňky nejvíce koncentrované a naopak v D řádku byly nejvíce naředěné.

3.12 Western blot analýza

3.12.1 SDS gelová elektroforéza

SDS-PAGE (polyakrylamid gelová elektroforéza) metoda je založena na separaci proteinů podle velikosti. Malé proteiny prochází gelem snáze a rychleji než velké proteiny, které migrují směrem k anodě pomaleji. To je z velké části umožněno pomocí SDS pufru, který proteinovou strukturu denaturuje a optimalizuje její tvar pro snazší průchod gelem. Zároveň dodává molekulám záporný náboj, aby mohly být posléze přitahovány ke kladně nabitě anodě.

Požadované množství buněk bylo centrifugováno (1500 x g, 10minut, 4 °C) a promyto v 1 ml 1 × PBS pH= 7,4 (5 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O, 5mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 0,45 mM NaCl). Po následovném stočení (1500 x g, 10 minut, 4 °C) byl pelet rozpuštěn nejprve v 60 μl 1×PBS a poté bylo přidáno 30 μl 3×SDS PAGE nanášecího pufru (SDS 6%, DTT 300 mM, TRIS-HCl pH 6,8 150 mM, 80% glycerol 30%, bromfenolová modř 0,02%). V posledním kroku byly buňky zahřívány 7 minut při 97 °C a tím byly získány zlyzované vzorky připravené pro nanášení na gel.

Do předem připravené aparatury byl vložen polyakrylamidový gel (BIO-RAD, mini-PROTEAN TGX stain free precast gel), na který byly naneseny 4 μl markeru (Prestained Protein ladder) a 15 μl vzorků. Aparatura byla po naplnění do jedné třetiny 10 × SDS-PAGE running pufrům (250 mM Tris ultrapure, 1,92 mM Glycin, 35 mM SDS, d. H₂O) zapojena do zdroje a spuštěna na 90 V, 20 minut. Po uplynulé době se napětí zvýšilo z 90 V na 130 V a zhruba dalších 40 minut trvalo, než vzorky doputovaly na spodní okraj gelu. V tento moment bylo jisté, že se proteiny patřičně rozdělily podle velikosti a další kroky Western Blot analýzy vedly k detekci sledovaného proteinu.

3.12.2 Přenos proteinů na membránu a jejich vizualizace

Pro úspěšný přenos proteinů z gelu na PVDF membránu byla potřebná její aktivace, která procházela třemi kroky. Započala ponořením membrány do methanolu (40 sekund),

pak do destilované vody (2 minuty) a konečným roztokem byl 1 × Transfer pufrem (48 mM Tris ultrapure, 39 mM glycin, 20% methanol, d. H₂O). Aktivovaná membrána byla vložena do blotovacího sendviče v následujícím pořadí: černý blotovací plát, houba (namočená v 1 × transfer pufru), filtrační papír (namočený v 1 × transfer pufru), gel, membrána, filtrační papír, houba, červený blotovací plát. Složený sendvič byl umístěn do aparatury na Western Blot, která byla naplněna 1 × transfer pufrem a nastavena na 100 minut, 100 V.

Po dokončení přenosu proteinů byla membrána ponořena na 1 hodinu do blokovacího roztoku, který byl připraven rozpuštěním 5 g sušeného odtučněného mléka v 95 ml PBS-T (ddH₂O, 0.05% Tween 20, 5 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O, 5mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 0,45 mM NaCl). Proteiny z tohoto roztoku zablokovaly nescifická místa na membráně, a tím zabránily navázání protilátek na tato místa a vzniku falešných výsledků. Následně proběhla inkubace v roztoku mléka s primární protilátkou. Po uplynulé hodině byla membrána nejprve promyta v 22 ml PBS-T 15 minut. Pak byl postup promývání opakován ale tentokrát ve třech cyklech po pěti minutách. Následovala opětovná inkubace v roztoku mléka, ale již se sekundární protilátkou a se stejným postupem promytí. Přehled všech sekundárních a primárních protilátek použitých v této práci je zobrazen v tabulce č. V. Na samotnou vizualizaci byl použit substrát ECL (BIO-RAD, Clarity Western ECL substrate), který reagoval s křenovou peroxidázou navázanou na sekundární protilátce. To mimo jiné způsobilo uvolnění signálu (luminiscence), který byl zachycen a vizualizován přístrojem ChemiDoc od firmy Bio-rad.

Tab. V: Použité primární a sekundární protilátky

Primární protilátka		Sekundární protilátka	
myší FLAG-tag	1:1000	anti-mouse HRP	1:2000
Hsp70	1:5000	anti-mouse	1:2000

3.13 Digitoninová subcelulární frakcionace

Tato metoda je založena na schopnosti digitoninu permeabilizovat membránu. Tímto způsobem je možné oddělit cytosolickou a organelární složku a zároveň detekovat studovaný protein.

Odebrané buňky (1×10^8 buň/ml) byly centrifugovány na 1300 x g, 10 minut, 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml PBS a stočen na 1300 x g, 10 minut, 4 °C. Po odstranění supernatantu byl pelet rozpuštěn v 500 μ l SoTE (mili-Q H₂O, 20 mM Tris-HCl pH=7.5, 0.6 M Sorbitol, 2 mM EDTA, pH=8.0) a po přidání 500 μ l SoTE s 0,03% digitoninem číslo 8896 (Mili-Q H₂O, 20 mM Tris-HCl pH=7.5, 0.6 M Sorbitol, 2 mM EDTA, pH=8.0, digitonin 244 μ l) byly vzorky lehce promíchány převrácením dnem vzhůru a umístěny na 5 minut na led. Po inkubaci následovalo stočení na 7000 rpm, 3 minuty, 4 °C. Ze zkumavek bylo opatrně odpipetováno prvních 500 μ l supernatantu, které představovaly cytosolickou frakci a po smíchání s 250 μ l 3 \times SDS page dye byly hotové vzorky uloženy na led. Zbýlý supernatant byl vyhozen a pelet rozpuštěn v 1 ml PBS. Do nových zkumavek bylo přemístěno 500 μ l tohoto roztoku a k němu bylo přidáno 250 μ l 3 \times SDS page dye. Takto vznikla organelární frakce, která byla společně s cytosolickou inkubována v nahřívacím bloku 7 minut při 97 °C. Vzorky byly poté zpracovány pomocí Western Blot analýzy (viz. výše) a vyhodnoceny přístrojem Chemi Doc (Bio-Rad). Použité protilátky jsou uvedeny v tabulce č. VI.

Tab. VI: Použité protilátky v metodě digitoninová subcelulární frakcionace

Primární protilátka		Sekundární protilátka	
APRT	1:100	anti-rabbit	1:2000
Hsp70	1:5000	anti-mouse	1:2000
FLAG-tag	1:1000	anti-mouse	1:2000

3.14 Test cytotoxicity (Alamar blue assay)

Tento test je založen na látce zvané resazurin, jehož vlastností se využívá při měření životaschopnosti buněk a jejich proliferace. V základním stavu se vyskytuje v modré barvě, avšak pokud proběhne proces redukce mění se na růžový resorufin. V rámci testování je možné sledovat redukci resazurinu živými buňkami, což se vyznačuje změnou barvy média a změnou resazurinu na fluorescenční resorufin (Rampersad, 2012). Metoda byla použita pro navrhnutí optimální koncentrace D-alaninu, kterým byly buňky indukovány.

Z linií 29-13 mt_DAO a 29-13 cyt_DAO bylo odebráno 5×10^6 buněk. Buňky byly poté smíchány s 5 ml odpovídajícího média a přelity do vaničky, odkud byly v následujících krocích nanášeny multikanálovou pipetou do jamek. V každé jamce byla koncentrace 5×10^4 buněk. Destička byla rozdělena do pomyslných šesti částí, jejichž rozložení vypadalo takto:

- V sloupci 1 A-F 200 μ l média sloužící jako kontrola
- V sloupci 1 G-H 100 μ l média s buňkami ke kontrole
- V sloupci 12 A-F 192,9 μ l média + 7,1 μ l D-alaninu (561 mM-zásobní roztok)
- V sloupci 12 A-F 200 μ l H₂O
- V sloupcích 3-11, A-H 100 μ l média

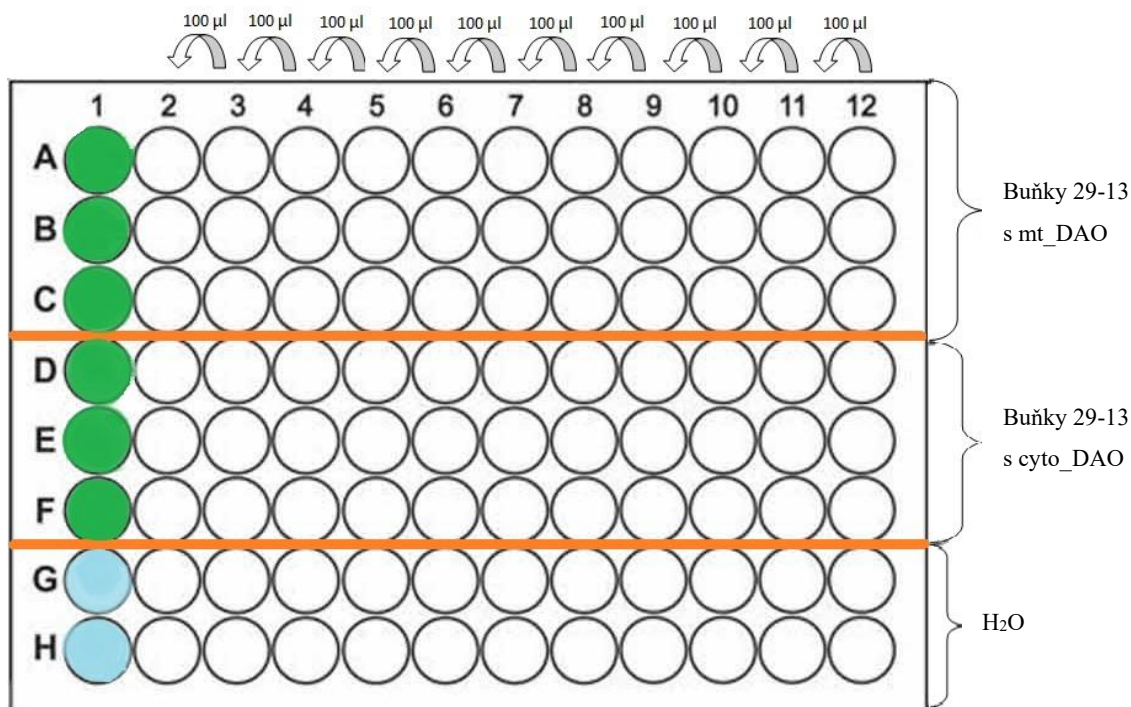
Po napipetování médií, vody a D-alaninu proběhlo postupné ředění se 100 μ l, které byly odebrány, přeneseny a po řádném promíchání opět odebrány do následující jamky. Ředění začínalo v místě s nejvyšší koncentrací D-alaninu (sloupec 12) a pokračovalo směrem doleva.

Řada klesajících koncentrací vypadala takto:

20 mM...10mM...5mM...2,5mM...1,25mM...0,6mM...0,3mM...0,15mM...0,075mM

Nakonec bylo přidáno ve směru zleva doprava, tedy do sloupců 2-12, 100 μ l buněk. Finální objem v každé jamce činil 200 μ l. Rozložení vzorků na destičce je znázorněno na Obr. 3. Takto zhotovená destička byla vložena do vlhčené komůrky a inkubovala se po dobu 48 hodin, 37 °C. V nadcházejícím kroku bylo do všech jamek napipetováno 20 μ l chemikálie resazurinu (1 \times PBS pH=7.3, resazurin sodium salt 0,5 mM) a po 24hodinové inkubaci byly vzorky změřeny pomocí přístroje Tecan Infinite. Měření probíhalo

při fluorescenční excitační vlnové délce v rozmezí 540-570 nm a fluorescenční emisní vlnové délce 580-610 nm. K vyhodnocení dat byl použit software GraphPad Prism.



Obr. 3: Resazurinový test na 96 jamkové destičce, zelená barva-médium, modrá barva-médium s buňkami bez D-alaninu

3.15 Růstová křivka

Pomocí růstové křivky byl sledován vliv D-alaninu na růst buněk při koncentracích 1 mM a 5 mM. Indukce a měření probíhalo po dobu čtyř dnů, vždy ve stejný čas.

Z testovaných kultur bylo odebráno 100 µl buněk a toto množství bylo zafixováno v 100 µl roztoku TrypFix (Mili-Q, 1 × SSC pufr, Formaldehyd 3,7%). V kyvetkách byl smíchán Hemosol (5 ml) s 50 µl buněčného roztoku a následovalo měření na přístroji Cell Coulter, který dokáže spočítat koncentraci buněk ve vzorku. Z výsledných hodnot bylo spočítáno, kolik ml má být z testovaných kultur odebráno, tak aby finální koncentrace odpovídala 4×10^6 buněk v 1 ml média. Od každé linie byly založené 3 vzorky, jeden neindukovaný a dva indukované s finální koncentrací 5mM a 1mM. První den indukce byl přidáván D-alanin na celkový objem 10 ml, zbylé dva dny se D-alanin přidával jen k množství nového média.

3.16 Měření produkce buněčných radikálů kyslíku (ROS)

DCFH-DA (2',7'-dichlorfluorescein diacetát) je látka schopná detekovat ROS v buňkách. DCFH-DA prochází do vnitřního prostředí buněk, kde přichází do styku s buněčnou esterázou, která odštěpuje acetylové skupiny za vzniku DCFH. Vlivem následné oxidace se DCFH molekula transformuje na fluorescenční DCF, kterou je možné změřit (Kim & Xue, 2020).

Bylo odebráno 2×10^7 buněk a toto množství bylo napipetováno na 24 jamkovou destičku. Celkový objem v jedné jamce činil 2 ml. Každá buněčná linie (29-13, 29-13 mt_DAO, 29-13 cyt_DAO) byla indukována D-alaninem. Přidávané množství se lišilo podle požadované koncentrace:

- 1mM= 3,6 μ l
- 5mM= 17,8 μ l
- 10mM= 35,6 μ l
- 15mM= 53,4 μ l

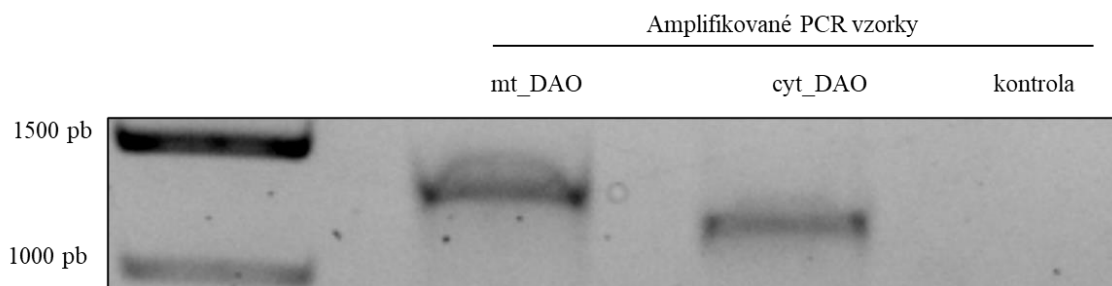
Pro kontrolu byla použita neindukovaná, nebarvená linie 29-13 a kultura s H_2O_2 v koncentracích 0 μ M, 200 μ M, 400 μ M a 800 μ M. Po přidání chemikálie ke vzorkům proběhla hodinová inkubace a ihned poté bylo odebráno a stočeno (1300 x g, 10 minut, 24 °C) 500 μ l z každé jamky. Pelet byl resuspendován v 1 ml příslušného média obsahující DCFH-DA (1000 x) a opět došlo k smíchání s D-alaninem. Tentokrát bylo ale přidávané množství počítané na 1 ml, a proto se hodnoty od indukce na destičce lišily. Zkumavky byly přikryty alobalem, vloženy na 30 min do inkubátoru (27 °C) a následně stočeny 10 minut, 13000 x g. Pelet byl promyt v 1 ml $1 \times$ PBS s D-alaninem, přidaným na 1 ml. Supernatant byl odstraněn a pokračovalo se s rozpuštěním peletu v 1 ml $1 \times$ PBS. Veškerý objem byl přenesen do FACS zkumavek, kam byl posléze přidán 1ml $1 \times$ PBS a D-alanin do 2 ml. Analýza vzorků proběhla na přístroji FACS. Nejdříve byly změřeny kontroly s H_2O_2 , poté kontrola bez fluorescence a teprve pak buňky, ve kterých jsme měřili produkci kyslíkových radikálů v závislosti na přidaném D-alaninu.

4 Výsledky

4.1 Zaklonování genu pro DAO do expresního plazmidu

Sekvence pro DAO z *Rhodotorula gracilis* byla upravena pro expresi u savců v laboratoři Vsevoloda Belousova (Addgene plasmid # 60344). Odtud byla převzata a následně optimalizována pro *Trypanosoma brucei*. Gen obsahoval nevyhovující kodóny, které byly vyměněny za jiné triplety nukleotidů, aniž by byla pozměněna kódující aminokyselina. Příkladem jsou kodóny pro arginin (CGA, AGA) či leucin (TTA, CTA). Další úprava se týkala tripletu na 3' konci, který kódoval serin, jenž je součástí targetovací sekvence do peroxisomu. Ovšem cílem této práce bylo zacílení do mitochondrie a cytosolu (blíže popsáno níže), a proto byla tato trojice nukleotidů odstraněna. Požadavky na úpravu genu zprostředkovala firma General Biosystems, která pozměněný gen nasyntetizovala a zaklonovala do plazmidu pUC57 DAO, se kterým probíhaly již samotné experimenty.

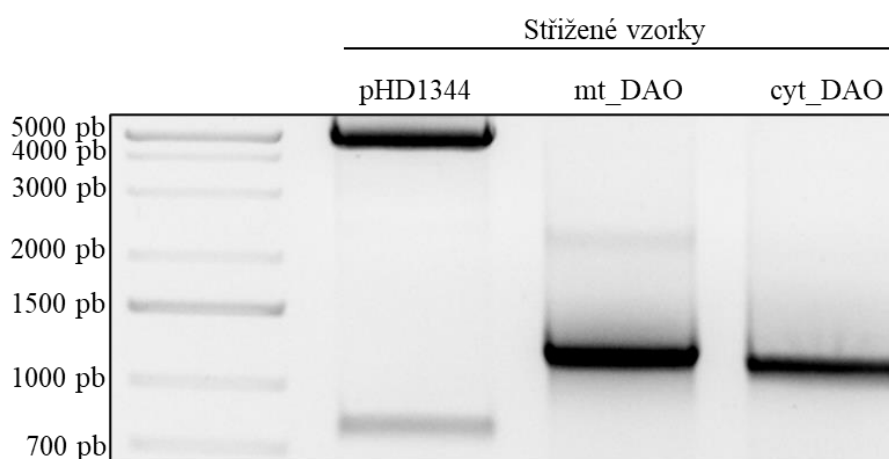
Plazmid pUC57 jsme namnožili v bakteriích *Escherichia coli* XL-1 blue. Následnou izolací jsme získali 359,2 ng/μl plazmidové DNA s čistotou 260/280 = 1,87, která sloužila jako templát pro PCR reakci. Tu jsme provedli za účelem amplifikace sekvence DAO. K namnožení požadovaného úseku jsme použili navržené forward a reverse primery. Jelikož jsme plánovali zacílit DAO do cytosolu a do mitochondrie, forward primery jsme celkově navrhli dva. Forward primer pro mitochondriální DAO navíc obsahoval mitochondriální cílovou sekvenci genu pro ISCU, u které jsme si již v minulosti ověřili její účinnost směřovat produkt do mitochondrie (Mach et al., 2013). Součástí reverse primeru byla sekvence kódující tzv. FLAG-tag, který bude sloužit k vizualizaci DAO pomocí komerčně dostupné protilátky. Ve forward a reverse primeru byla také restriční místa HindIII a BamHI, která jsme později využili při stříhání a vkládání PCR fragmentů do plazmidu pHD13-44. Po přečištění produktů s GenElute PCR Clean-up kitem jsme naměřili u vzorku s lokalizací do mitochondrie 87,6 ng/μl, v případě cytosolického vzorku to činilo 61,2 ng/μl plazmidové DNA. Úspěšnost PCR reakce jsme ověřili pomocí elektroforetické analýzy (Obr. 4.).



Obr. 4: Ověření velikosti DNA fragmentů pro mitochondriální DAO (*mt_DAO*) a cytosolickou DAO (*cyt_DAO*) amplifikovaných pomocí PCR reakce. V levém sloupci je vyznačen DNA marker, v pravém pak negativní kontrola.

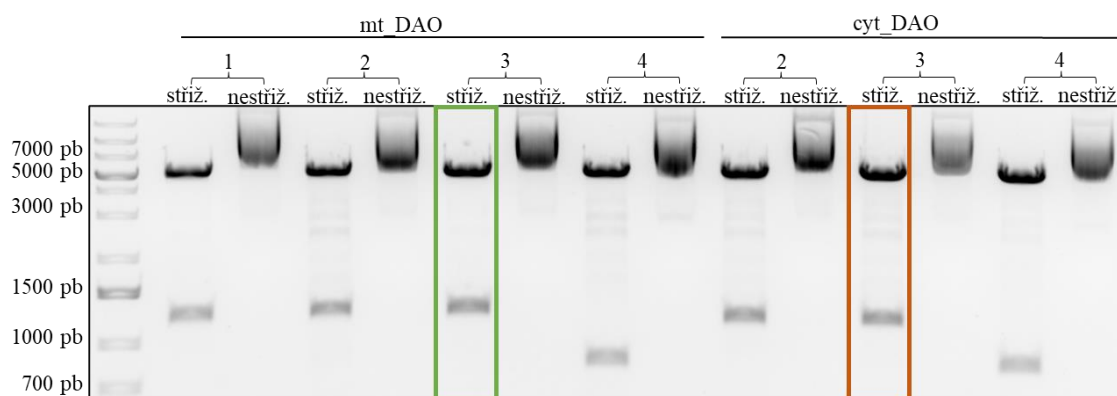
U negativní kontroly není pozorovatelný žádný signál. Na DNA gelu byl vizualizován fragment pro mitochondriální DAO o velikosti 1207 pb a také fragment pro cytosolickou DAO o velikosti 1132 pb. Rozdíl ve velikosti je způsoben přítomností targetovací ISCU sekvence, která se vyskytuje pouze u fragmentu pro mitochondriální DAO.

Plazmid pHD13-44 s rezistencí na puromycin jsme namnožili v bakteriích *Escherichia coli* XL-1 blue a získali tak plazmidovou DNA o koncentraci 78,1 ng/μl. Tu jsme pomocí enzymů HindIII a BamHI rozštěpili. To samé jsme provedli s fragmentem pro *mt_DAO* a *cyto_DAO*, abychom dosáhli kohezivních konců potřebných pro ligaci DAO fragmentu do plazmidu pHD 13-44. Restriktci jsme ověřili pomocí elektroforetické analýzy (Obr. 5). U plazmidu jsme po restriktci očekávali velikosti fragmentů 5060 pb a 796 pb, což se nám potvrdilo.



Obr. 5: Restriktční analýza enzymy HindIII, BamHI plazmidu pHD13-44 a *mt_DAO* a *cyto_DAO* fragmentu. DNA marker je vyznačen vlevo.

Namísto kratšího úseku (796 pb) jsme v následujících krocích do plazmidu vložili sekvenci pro DAO. Delší plazmidovou část (5060 pb) jsme společně s mitochondriálním a cytosolickým fragmentem vyřízli z gelu, přečistili, smíchali ve správném molárním poměru a po inkubaci jsme ligační směs zatransformovali do bakterií *Escherichia coli* XL-1 blue, abychom plazmid namnožili. Na základě restrikční analýzy, provedené enzymy HindIII, BamHI, jsme pro následnou transfekci do buněk *Trypanosoma brucei* vybrali plazmidy, které obsahovaly správný inzert (Obr. 6). V případě plazmidu s mt_DAO jsme vybrali klon 3 o koncentraci 510,6 ng/μl a u plazmidu s cyt_DAO jsme zvolili klon 3 o koncentraci 447,8 ng/μl.



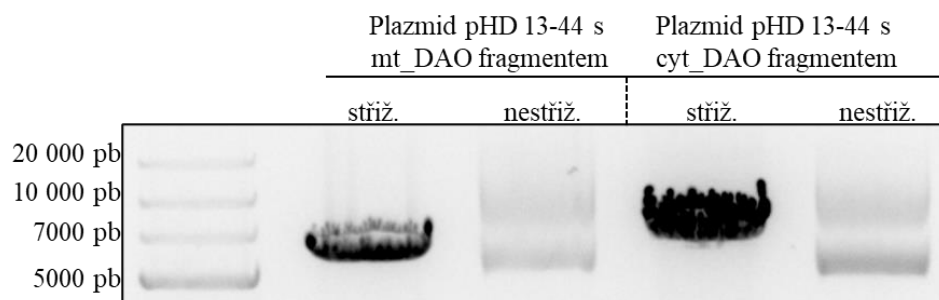
Obr. 6: Restrikční analýza u liganých plazmidů s mitochondriální (*mt_DAO*) a cytosolickou DAO (*cyt_DAO*)

Na obrázku jsou viditelné střížené plazmidy a vedle nich umístěné kontroly v podobě nestřížených plazmidů. Inzerty klonu 4 neměly očekávanou velikost mitochondriální a cytosolické DAO. Pravděpodobně se jednalo o kontaminaci parentálním plazmidem pHD 13-44, jenž obsahuje inzert o velikosti 796 pb, ke které mohlo dojít při extrakci vzorků z gelu a manipulaci s nimi. Zvýrazněné klony 3 jsme použili pro následnou transfekci do *Trypanosoma brucei*.

Vybrané klony jsme společně s našimi vlastními primery AZ0009 Fw, AZ0500 Rv poslali firmě SEQme na osekvenování. Na základě toho jsme mohli v programu Geneious ověřit úspěšnost zaklonování DAO do plazmidu.

4.2 Vytvoření transgenní linie *Trypanosoma brucei*

Před samotnou transfekcí expresního plazmidu do *T. brucei* jsme použili enzym NotI, abychom získali linearizovanou formu této molekuly. U plazmidu z klonu 3 s mitochondriální DAO jsme očekávali velikost 6267 pb, u plazmidu z klonu 3 s cytosolickou sekvencí 6192 pb. Restriční analýza je zobrazena na Obr. 7.



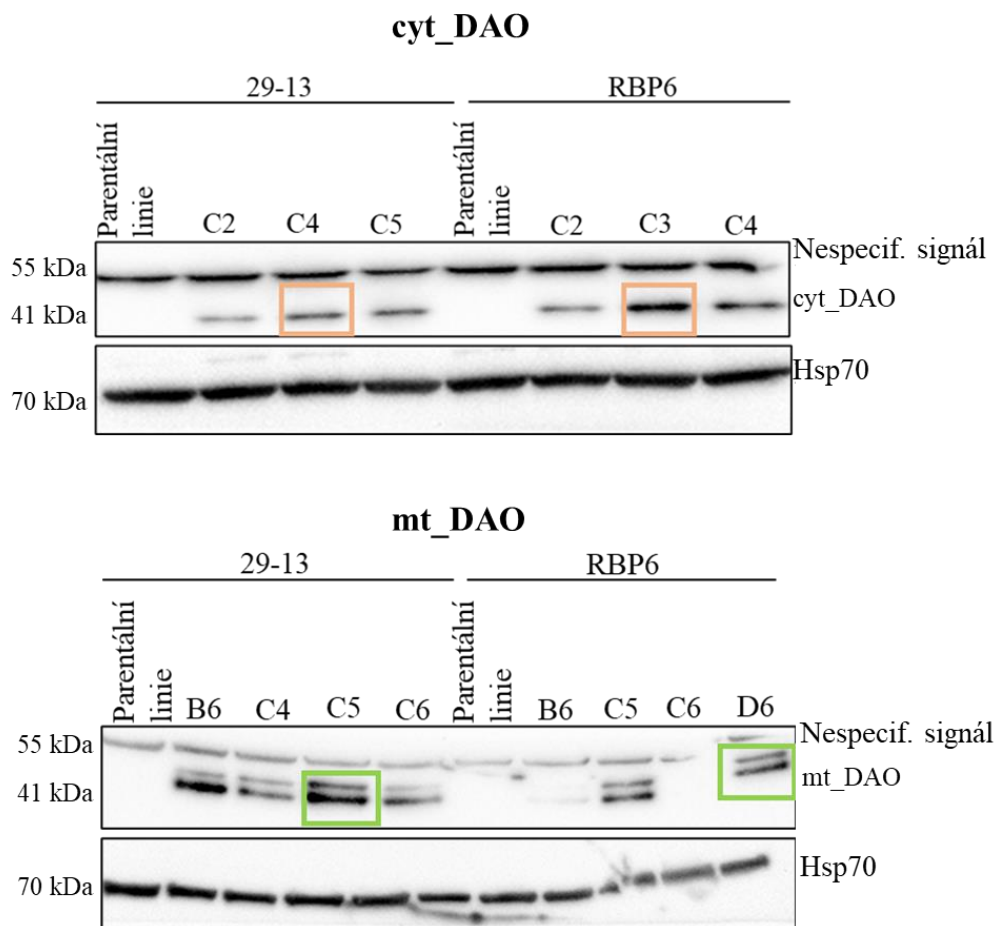
Obr. 7: Linearizovaný plazmid pHD13-44 s fragmentem pro mt_DAO a cyt_DAO

Na obrázku můžeme pozorovat rozdílnou polohu stříženého a nestříženého plazmidu, i když jsou sekvenčně stejné, a tudíž bychom je měli detekovat ve stejné výšce. Je to z toho důvodu, že nestřížený plazmid je těsněji sbalený, a proto prochází gelem rychleji než linearizované.

Vzorky jsme následně přečistili ethanolovou precipitací a linearizovanou DNA jsme pomocí elektroporace vložili do dvou buněčných linií *Trypanosoma brucei*, parentální linie 29-13 a linie, ve které jsme schopni spustit buněčnou diferenciaci pomocí indukce exprese RBP6. U každé linie jsme zvlášť selektovali buňky buď s DAO s lokalizací do mitochondrie, nebo s lokalizací do cytosolu. Po pár týdnech se nám podařilo získat několik klonů od každé linie, u kterých jsme předpokládali správně vloženou DAO sekvenci do jejich genomu.

4.3 Ověření exprese mitochondriální a cytosolické DAO

Pro dosvědčení, že vyselektované buňky produkují D-amino oxidázu jsme otestovali vzorky pomocí Western Blot analýzy. To vyžadovalo přípravu buněčných lyzátů s 3×SDS PAGE nanášecího pufri. Vzorky jsme poté rozdělili podle velikosti pomocí SDS gelové elektroforézy. Proteiny jsme přenesli z gelu na aktivovanou membránu v blotovacím sendviči umístěném ve Western Blot aparatuře. Obě formy DAO byly detekovány pomocí primární protilátky anti-FLAG, který rozeznává specifickou aminokyselinovou sekvenci DYKDDDDK, jenž se nachází na C-konci proteinu. Po inkubaci s protilátkami jsme vizualizací membrány (Obr. 8) ověřili předpokládanou velikost proteinu (41 kDa) a sílu signálu. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků na gel byla použita protilátka proti mitochondriálnímu proteinu Hsp70.



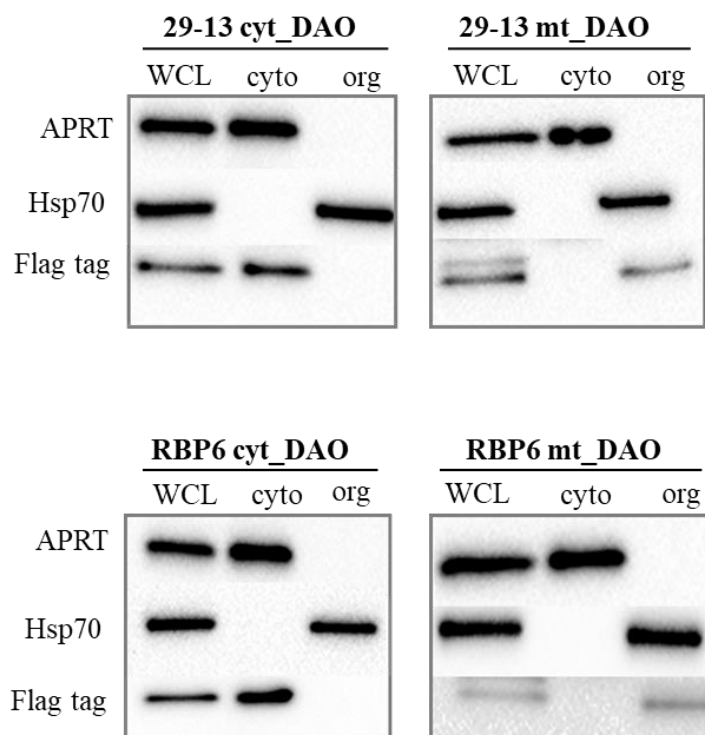
Obr. 8: Ověření exprese DAO v linii 29-13, RBP6 pomocí Western Blotu

Na obrázku je patrné, že v parentálních liniích, které sloužili jako kontrola, není viditelný žádný signál. U cytosolické DAO jsme ve všech klonech u obou linií detekovali signál o 41kDa prokázali tak expresi cytosolické D-amino oxidázy. V případě mitochondriální DAO jsme produkci proteinu potvrdili ve všech vzorcích s výjimkou klonu C6. U cytosolické DAO jsme detekovali pouze jeden specifický band, nicméně v případě mitochondriální DAO, protilátka rozeznávala dva bandy o přibližně odpovídající velikosti. Je možné, že větší band je mitochondriální DAO, u které nebyl odštipnut mitochondriální lokalizační signál, a tudíž tento protein setrvává v cytosolu. Na gelech je také viditelný nespecifický signál o velikosti 55 kDa. Detekovali jsme ho v rámci všech vzorků i těch, které neobsahují gen pro DAO. Pravděpodobně se jedná o vazbu protilátky anti-FLAG tag na nespecifický protein v buňce.

Pro další experimenty jsme vybrali klony s nejintenzivnějším signálem (29-13_cytDAO_C4, 29-13_mtDAO_C5, RBP6_cytDAO_C3 RBP6_mtDAO_D6).

4.4 Verifikace buněčné lokalizace mitochondriální a cytosolické DAO

Poté co jsme pomocí Western Blotu prokázali, že je gen pro mt_DAO či cyt_DAO v buňce exprimován, jsme v dalším kroku ověřili jeho lokalizaci. Pomocí metody digitoninové subcelulární frakcionace jsme využili schopnosti detergentu digitonin, na oddělení organelární složky od cytosolické. Následně jsme proteiny separovali podle velikostí na SDS gelové elektroforéze a pomocí protilátek APRT, Hsp70, FLAG tag jsme detekovali příslušné proteiny (Obr. 9). Pro kontrolu jsme použili celobuněčné lyzáty (WCL). Lokalizaci obou forem DAO jsme ověřili u linie 29-13 a RBP6.



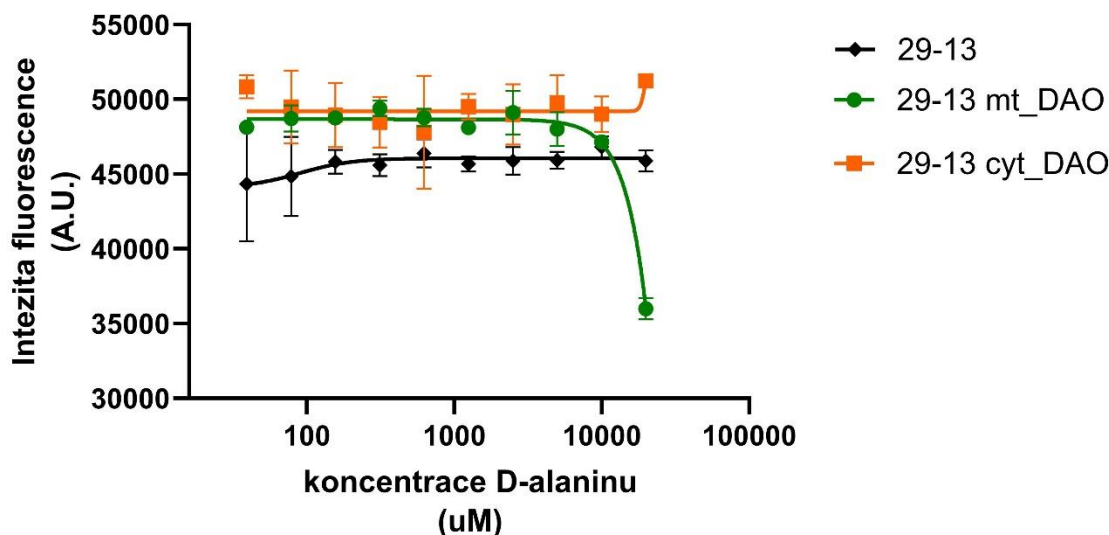
Obr. 9: Subcelulární frakcionace u cytosolické (cyt.DAO), mitochondriální (mt.DAO) DAO v liniích 29-13 a RBP6. WCL – celobuněčný lyzát (whole cell lysate), Cyto – cytosolická frakce, Org – organelární frakce, APRT – cytosolický marker, Hsp70 – mitochondriální marker, Flag tag – marker DAO

U obou linií se nám úspěšně podařilo lokalizovat cytosolickou DAO v cytosolu a mitochondriální DAO v mitochondrii.

4.5 Kontrola cytotoxicity D-alaninu u buněk *Trypanosoma Brucei*

Jelikož se produkce H_2O_2 enzymem DAO spouští pomocí D-alaninu neboli aminokyseliny, která se v buňce za normálních okolností nevyskytuje, chtěli jsme nejdříve zjistit, v jakých koncentracích není tato aminokyselina pro buňky škodlivá a naopak při jaké koncentraci bude již pro buňky *T.brucei* toxická. K tomuto účelu jsme zvolili Alamar Blue assay, která je vhodná ke stanovení hodnot EC_{50} , tzv. účinné koncentraci látky, při které dochází k 50 % zamezení růstu studovaného organismu. Během tohoto testu jsme do buněčných kultur aplikovali D-alanin v sedmi odlišných koncentracích a sledovali jeho vliv na buňky.

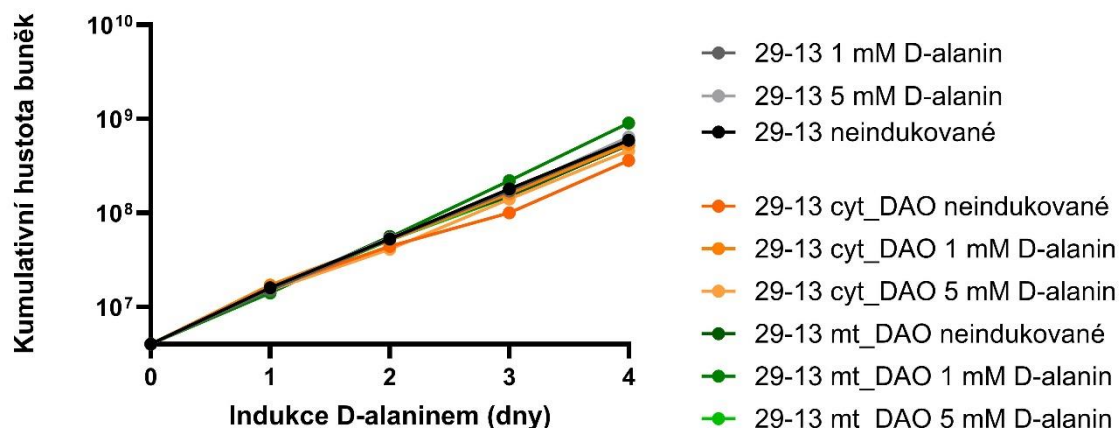
K napipetovaným vzorkům na destičce jsme přidali modrý resazurin, který se v přítomnosti metabolicky aktivních látek mění na růžový resorufin. Tato přeměna je doprovázena fluorescenčním zářením, které lze změřit a vyhodnotit (Obr. 10). Pracovali jsme s parentální linií 29-13 bez DAO, s linií 29-13 exprimující mt_DAO (klon C5) a s linií 29-13 exprimující cyt_DAO (klon C4).



Obr. 10: Alamar Blue assay s buňkami *T. brucei* a různými koncentracemi D-alaninu

Na ose x je zobrazena koncentrace D-alaninu přidávaného k buňkám. Osa y představuje intenzitu fluorescence produkovanou buňkami. Na parentální linii 29-13 bez DAO neměl D-alanin žádný vliv. To samé lze pozorovat u buněk s cyt_DAO. V případě buněk s mt_DAO jsme zaznamenali pokles fluorescence při 20 mM koncentraci D-alaninu. Je možné, že při této koncentraci dochází k silné produkci a akumulaci H_2O_2 v mitochondrii buňky, což má vliv na růst buněk.

S pomocí resazurinového testu jsme zjistili, že námi použité koncentrace D-alaninu nemají na růst buněk negativní vliv. Přesto jsme se rozhodli ještě otestovat dvě vybrané koncentrace metodou růstové křivky. Buňky rostly po dobu čtyř dnů v přítomnosti D-alaninu o koncentraci 1 mM a 5 mM (Obr. 11).



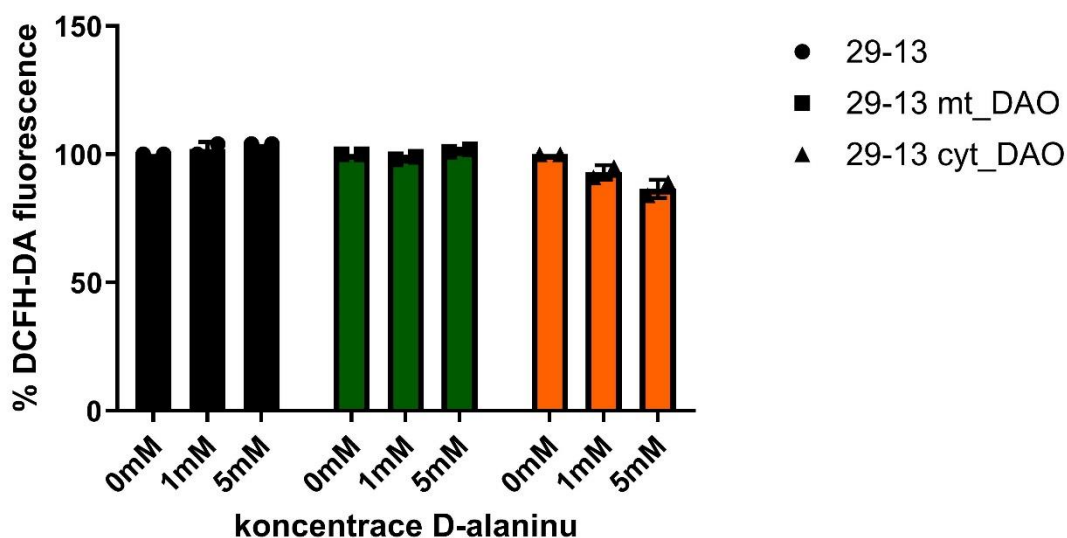
Obr. 11: Růstová křivka s buňkami *T. brucei* a 1mM, 5mM koncentracemi D-alaninu

Na grafu můžeme pozorovat kontinuální růst buněk, a proto můžeme konstatovat, že je D-alanin ve výše uvedených koncentracích pro buňky netoxický.

4.6 Spuštění produkce ROS pomocí D-alaninu

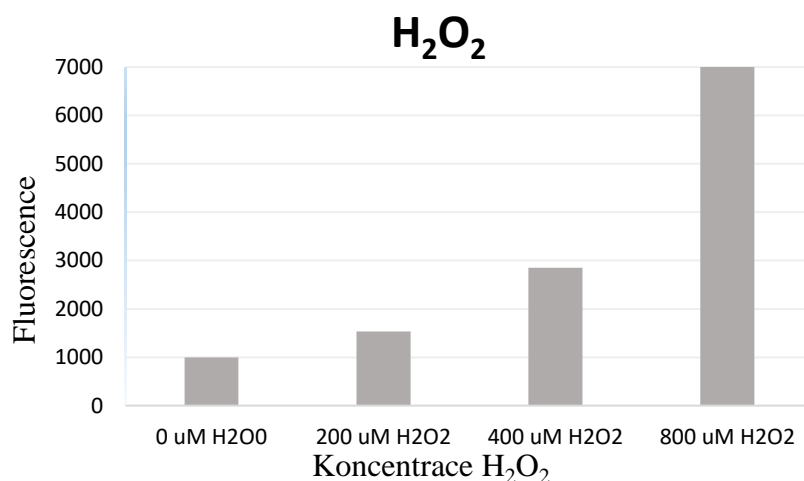
Enzym D-amino oxidáza může být aktivována pomocí aminokyseliny D-alaninu, což vede k produkci H_2O_2 v buňce. Jeho množství je pak možné měřit pomocí fluorescenční próby DCFH-DA a průtokové cytometrie.

V pilotním pokusu jsme buňky indukovali D-alaninem v koncentracích 1 mM, 5 mM ve 24hodinovém intervalu po dobu čtyř dnů. Poslední den jsme k odebraným vzorkům přidali DCFH-DA látku a po promytí $1 \times$ PBS jsme buňky analyzovali průtokovou cytometrií (Obr. 12) Testovali jsme linii 29-13, která neexprimuje DAO, a tudíž jsme ve všech měřených vzorcích neočekávali odezvu na D-alanin. V případě linií 29-13 s cytosolickou a mitochondriální DAO jsme předpokládali vzestupně rostoucí hodnoty podle zvyšujících se koncentrací přidávaného D-alaninu. Jako pozitivní kontrolu jsme použili buňky, ke kterým byl přidán H_2O_2 v koncentracích 0 μ M, 200 μ M, 400 μ M a 800 μ M (Obr. 13).



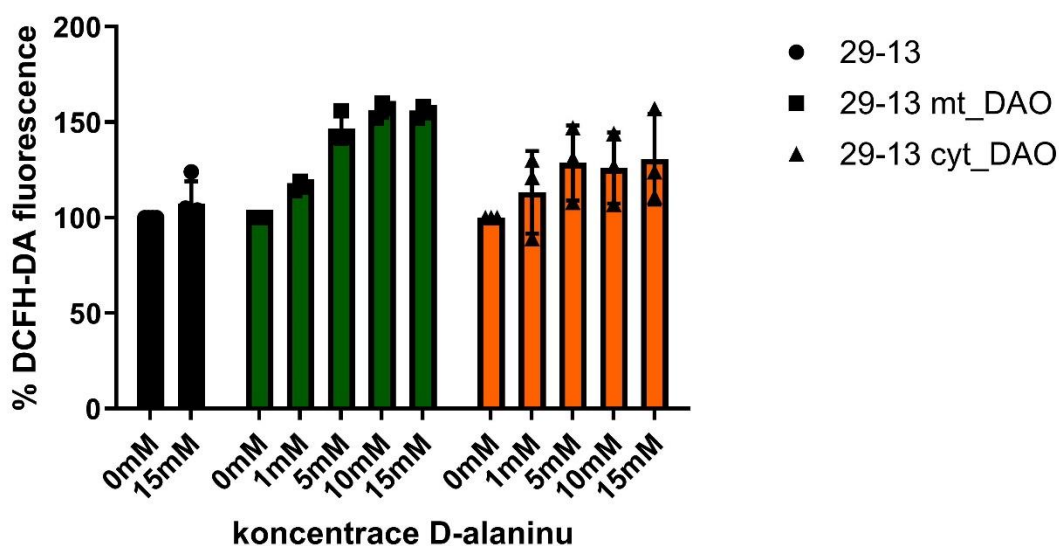
Obr. 12: Produkce ROS v buňkách indukovaných D-alaninem (4 dny)

Na ose x je zobrazena koncentrace D-alaninu přidávaného k buňkám. Osa y ukazuje relativní hodnoty fluorescence, kdy intenzita fluorescence naměřená pro buňky bez inkubace s D-alaninem byla stanovena jako 100%. Měření, ze kterého vycházejí hodnoty zobrazené v grafu, jsme celkově zopakovali dvakrát (typ technického měření). Náš předpoklad, že u buněk s větším množstvím přidávaného D-alaninu zaznamenáme vyšší nárůst fluorescence, tedy více molekul H_2O_2 , se v tomto případě nepotvrdil. U mitochondriálních indukovaných vzorků můžeme dokonce pozorovat pokles fluorescence oproti neindukované 29-13 linii. Příčinou těchto výsledků, mohlo být to, že v promývacích krocích nebyl již v pufru přítomen D-alanin, a tudíž chyběl substrát pro enzym DAO k produkci H_2O_2 . Již vytvořené H_2O_2 mohlo být detoxifikované antioxidantním systémem buňky na původní hodnoty měřené bez inkubace s D-alaninem. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli změnit metodický přístup a přidávat D-alanin také do promývacích pufrů.



Obr. 13: Kontrola s peroxidem vodíku (H₂O₂) pro měření produkce ROS

V rámci druhého měření hodnot ROS jsme zkrátili dobu inkubace ze čtyř dnů na jednu hodinu (Obr. 14). Zároveň jsme se soustředili na to, aby byly buňky v neustálém kontaktu s D-alaninem. Z toho důvodu jsme ho přidávali ke vzorkům před hodinovou inkubací i do promývacích roztoků a do zkumavek pro průtokovou cytometrii. Rozšířili jsme i škálu testovaných koncentrací o 1 mM, 5 mM, 10 mM a 15 mM.



Obr. 14: Produkce ROS v buňkách indukovaných D-alaninem (inkubace 1 hodina)

V grafu jsou vyhodnoceny biologické triplikáty pokusu. Nejvyšší nárůst H_2O_2 v buňkách je patrný mezi koncentracemi 1 mM a 5 mM. U následujících koncentrací je náznak stagnace. V linii 29-13 bez exprese DAO nedochází k signifikantnímu nárůstu fluorescence.

5 Diskuze

Cílem mé práce bylo zainkorporovat gen pro DAO do genomu parazita *Trypanosoma brucei* a získat tak transgenní linii s možností spustit řízenou produkcí H₂O₂. Toto lze následně využít při zkoumání vlivu ROS na buněčnou diferenciaci tohoto parazita. Konkrétně jsme pracovali s parentální linií 29-13 a s linií schopné in vitro diferenciaci, nazývanou RBP6 linie (Kolev et al., 2012). Sekvenci genu pro DAO jsme upravili tak, že jeho produkt byl buď cílen do mitochondrie nebo cytosolu, což jsme následně ověřili pomocí metody digitoninové subcelulární frakcionace. Takto modifikované buňky jsme v různém časovém období inkubovali s několika koncentracemi D-alaninu a poté jsme měřili zvýšenou úroveň mitochondriálních a cytosolických molekul H₂O₂ vyprodukovaných D-amino oxidázou pomocí průtokové cytometrie.

K určení vlivu místa produkce ROS na buněčnou diferenciaci, je důležité umístit enzym DAO do různých částí buňky. Tímto způsobem budeme následně schopní charakterizovat a rozlišit účinky místa vzniku ROS na diferenciaci buněk. Rozhodli jsme se proto nasměrovat DAO do cytosolu a do mitochondrie. Během ověřování exprese genu pomocí western blot analýzy a specifické protilátky rozeznávající FLAG značku připojenou na C-konec DAO, jsme u mitochondriální verze DAO pozorovali dvojitý signál (Obr. 8). Je možné, že horní signál představuje prekurzor DAO s neodštěpeným mitochondriálním lokalizačním signálem. Ke genu DAO jsme připojili sekvenci o velikosti 75 pb, jenž pochází z genu pro ISCU (iron sulphur cluster assembly protein) a byl v minulosti ověřen jako účinný mitochondriální lokalizační signál (Mach et al., 2013; Taleva et al., 2023). Když je tato sekvence přeložena do aminokyselin je velká 2,8 kDa a tento rozdíl je rozeznatelný na SDS PAGE gelech. Za normálních okolností je přenos mitochondriálních proteinů z cytosolu do mitochondrie zprostředkován pomocí TOM komplexu, který je součástí vnější membrány mitochondrie. Po rozpoznání sekvence mitochondriálního lokalizačního signálu na N-konci proteinu začne proces translokace přes vnější a vnitřní membránu mitochondrie. Do tohoto děje je zapojen, jak kanál Tom 40, tak translokáza TIM (Harsman & Schneider, 2017). Je možné, že tento systém nebyl při přenosu mt_DAO efektivní jako obvykle, a tudíž nedošlo k úplnému přenosu mt_DAO proteinu do mitochondrie. Část mt_DAO zůstala v cytosolu, a tudíž byla detekovaná. Zajímavým faktem je, že tato cytosolická frakce nebyla odstraněna buněčným proteolytickým mechanismem (proteazomem), který je schopný degradace špatně cílených či špatně

sbalených proteinů a brání tak nahromadění nesprávně lokalizovaných proteinů (Dewar et al., 2022). Možným vysvětlením by mohla být skutečnost, že pro *T. brucei* je mt_DAO nepřírodným proteinem, a proto není buňkou efektivně rozpoznán, není označen ubiquitinem pro degradaci, a tudíž není zneškodněn proteazomem. Pokud je toto pravda, komplikuje to specificitu produkce H₂O₂ v mitochondrii, jelikož tato frakce mt_DAO bude produkovat H₂O₂ v cytosolu, či v blízkosti vnější mitochondriální membrány. Zmíněná komplikace by mohla být vyřešena použitím jiného mitochondriálního lokalizačního signálu či přímým připojením DAO k proteinu, který se nachází v matrix mitochondrie (např. succinyl-CoA-syntetáza) Bylo by také zajímavé připojit DAO k proteinu, který je cílen k vnitřní membráně mitochondrie (podjednotka komplexu II směřující směrem do matrix), či do mezimembránového prostoru (např. Mia, Erv1) a tím, získat detailnější nástroj pro studium efektu mitochondriálních ROS molekul na buňku.

Během testování cytotoxicity D-alaninu metodou Alamar Blue jsme zjistili, že indukce mt_DAO buněk 10mM D-alaninem a následná produkce H₂O₂, působila na buňky mírně toxicky. Příčinou může být akumulace H₂O₂ v mitochondriích, což může způsobit poškození důležitých makromolekul (např. lipidů, DNA nebo proteinů). Zvýšená hladina ROS může způsobit dysfunkci proteinů, poškození propustnosti membrán a stejně tak narušení struktury DNA s následnými mutacemi. Tyto zásahy mohou vést až k buněčnému zániku, a proto je možné, že jsme na grafu pozorovali značně sníženou viabilitu buněk *T. brucei*. V mitochondrii existuje detoxifikační systém, který je u trypanozóm závislý na specifické molekule trypanothion a enzymu trypanothion reduktáza (Ebersoll et al., 2020). Nicméně je možné, že při indukované produkci H₂O₂ je tento systém zahlcen a dochází k nárůstu hladin H₂O₂. Unikátní ROS detoxifikační systém v mitochondrii *T. brucei* nebyl doposud podrobně prozkoumán a náš výsledek otevírá zajímavou otázku ohledně kapacity detoxifikačních drah.

Při spuštění produkce ROS jsme v pilotním pokusu získali data, která se neshodovala s naším předpokladem, a to že s narůstajícím množstvím přidávaného D-alaninu poroste i počet molekul H₂O₂ produkovaných D-amino oxidázou změřených pomocí fluorescenční próby DCF (2',7'-dichlorfluorescein) a průtokové cytometrie (Obr.12). Fluorescence DCF neměla tendenci se oproti neindukovaným vzorkům zvyšovat. Patrně je na vině antioxidantní buněčný systém, opět na bázi trypanothionu, který chrání buňku před ROS molekulami, tím že je redukuje na méně škodlivé elementy. Pro *T. brucei* jsou typické v cytosolu se vyskytující peroxiredoxiny či glutathione reduktázy (Krauth-Siegel &

Comini, 2008). Zajímavým faktem je, že v genomu *T. brucei* chybí gen pro katalázu, běžný enzym, který velice efektivně katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Chmelová et al., 2022). Jelikož nebyl D-alanin, jakožto důležitý substrát pro spuštění produkce H₂O₂, součástí promývacích pufrů, je možné, že buňka stihla H₂O₂ detoxifikovat ještě před naším měřením. Problém jsme vyřešili zkrácením inkubační doby a přidáním D-alaninu i do promývacích pufrů. Díky těmto změnám jsme ve druhém měření pozorovali viditelný nárůst H₂O₂, jakožto odpovědi na přidávaný D-alanin. Po porovnání změřených hodnot, můžeme konstatovat, že v mitochondrii jsme detekovali vyšší hladiny H₂O₂ molekul než v cytosolu. Zřejmě je to z toho důvodu, že cytosolický antioxidační systém je robustnější, než ten mitochondriální.

6 Závěr

V této práci byl enzym DAO integrován do genomu *Trypanosoma brucei* za účelem produkce H_2O_2 . Jedná se o vůbec první experiment, kdy byla DAO použita ve spojení s tímto modelovým organismem, a proto přispívá i k pochopení, jak buňka na tento enzym reaguje. DAO se podařilo vložit do genomu parentální linie 29-13 a linie RPB6, u které je možné spustit buněčnou diferenciaci in vitro pomocí indukce exprese RNA vazebného proteinu 6 (Doleželová et al., 2020). Zároveň byl tento enzym úspěšně zacílen do mitochondrie a cytosolu, což nám poskytlo možnost srovnání působení enzymu DAO v těchto různých buněčných kompartmentech. V buňkách byla samotná produkce H_2O_2 spuštěna pomocí DAO substrátu D-alaninu a měřena pomocí průtokové cytometrie. V rámci testování bylo předpokládáno, že hladina ROS molekul poroste, lineárně ve vztahu k navyšující se koncentraci přidávaného D-alaninu. Tento trend byl nejvíce patrný u buněk indukovaných 1mM a 5mM D-alaninem, zatímco u vyšších koncentrací byl náznak stagnace.

Po vložení DAO genu do genomu *T.brucei*, jsme získali užitečný nástroj pro produkci ROS v mitochondrii a cytosolu. V budoucnu se chystáme jeho využití optimalizovat pomocí dalších D-aminokyselin. Plánujeme také spustit produkci H_2O_2 v RBP6 linii a sledovat, zda jeho zvýšená hladina napomáhá diferenciaci buněk *T.brucei*. Plánujeme také cílit DAO do různých částí mitochondrie (vnitřní membrány, oblasti krist, mezimembránového prostoru či do vnější membrány) a tím získat detailnější informace o prostorové důležitosti produkce H_2O_2 . Další možností je připojit DAO k fluorescenční sondě HyPer7 pomocí které bychom mohli detekovat přímou tvorbu H_2O_2 v dané části buňky či mitochondrie (Pak et al., 2020). Tímto způsobem bude možné sledovat dynamiku H_2O_2 molekul v buňce.

7 Seznam použité literatury

ABREU, Isabel A. a CABELLI, Diane E., 2010. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. Č. 2, s. 263-274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>. [cit. 2024-03-27].

ADAM-VIZI, Vera, 2005. Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: Contribution by Electron Transport Chain and Non–Electron Transport Chain Sources. Online. *Antioxidants & Redox Signaling*. Roč. 7, č. 9-10, s. 1140-1149. ISSN 1523-0864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1140>. [cit. 2024-03-23].

BECKMAN, Kenneth B. a AMES, Bruce N., 2006. Mitochondrial aging: open questions. Online. *The New York Academy of Sciences*. Č. 1, s. 118-127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09897.x>. [cit. 2024-03-24].

BLEIER, Lea a DRÖSE, Stefan, 2013. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Roč. 1827, č. 11-12, s. 1320-1331. ISSN 00052728. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>. [cit. 2024-03-25].

BOREGGIO, Marta; ROSINI, Elena; GAMBAROTTI, Cristian; POLLEGIONI, Loredano a FASOLI, Elisa, 2022. Unveiling the Bio-corona Fingerprinting of Potential Anticancer Carbon Nanotubes Coupled with d-Amino Acid Oxidase. Online. *Molecular Biotechnology*. Roč. 64, č. 10, s. 1164-1176. ISSN 1073-6085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00488-y>. [cit. 2024-03-22].

BRAND, Martin D., 2016. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. Roč. 100, s. 14-31. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>. [cit. 2024-03-23].

DEWAR, Caroline E.; OELJEKLAUS, Silke; MANI, Jan; MÜHLHÄUSER, Wignand W. D.; VON KÄNEL, Corinne et al., 2022. Mistargeting of aggregation prone mitochondrial proteins activates a nucleus-mediated posttranscriptional quality control pathway in trypanosomes. Online. *Nature Communications*. Roč. 13, č. 1, s. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30748-z>. [cit. 2024-04-06].

- DOLEŽELOVÁ, Eva; KUNZOVÁ, Michaela; DEJUNG, Mario; LEVIN, Michal; PANICUCCI, Brian et al., 2020. Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of *Trypanosoma brucei*. Online. *PLOS Biology*. 2020-6-10, roč. 18, č. 6. ISSN 1545-7885. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000741>. [cit. 2024-03-30].
- EBERSOLL, Samantha; BOGACZ, Marta; GÜNTER, Lina M; DICK, Tobias P a KRAUTH-SIEGEL, R Luise, 2020. A tryparedoxin-coupled biosensor reveals a mitochondrial trypanothione metabolism in trypanosomes. Online. *ELife*. 2020-01-31, roč. 9. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.53227>. [cit. 2024-04-10].
- FERENČÍK, Miroslav a ŠKÁRKA, Bohumil, 2000. *Biochémiá*. Bratislava: Slovak Academic Press. ISBN 80-88908-58-2.
- FORRESTER, Steven J.; KIKUCHI, Daniel S.; HERNANDES, Marina S.; XU, Qian a GRIENDLING, Kathy K., 2018. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. Online. *Circulation Research*. 2018-03-16, roč. 122, č. 6, s. 877-902. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>. [cit. 2024-03-29].
- FRANK, Magdalena; DUVEZIN-CAUBET, Stéphane; KOOB, Sebastian; OCCHIPINTI, Angelo; JAGASIA, Ravi et al., 2012. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Roč. 1823, č. 12, s. 2297-2310. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.007>. [cit. 2024-03-29].
- FRIDOVICH, Irwin, 1997. Superoxide Anion Radical (O^{•2}), Superoxide Dismutases, and Related Matters. Online. *Journal of Biological Chemistry*. Roč. 272, č. 30, s. 18515-18517. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>. [cit. 2024-03-27].
- FUCHS, Sabine A.; BERGER, Ruud; KLOMP, Leo W.J. a DE KONING, Tom J., 2005. D-Amino acids in the central nervous system in health and disease. Online. *Molecular Genetics and Metabolism*. Roč. 85, č. 3, s. 168-180. ISSN 10967192. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.03.003>. [cit. 2024-04-10].

HANDY, Diane E. a LOSCALZO, Joseph, 2022. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. Roč. 188, s. 146-161. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004>. [cit. 2024-03-28].

HARSMAN, Anke a SCHNEIDER, André, 2017. Mitochondrial protein import in trypanosomes: Expect the unexpected. Online. *Traffic*. Roč. 18, č. 2, s. 96-109. ISSN 1398-9219. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/tra.12463>. [cit. 2024-04-10].

CHMELOVÁ, Ľubomíra; BIANCHI, Claretta; ALBANAZ, Amanda T. S.; REŽNAROVÁ, Jana; WHEELER, Richard et al., 2022. Comparative Analysis of Three Trypanosomatid Catalases of Different Origin. Online. *Antioxidants*. Roč. 11, č. 1. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11010046>. [cit. 2024-04-10].

KIM, Hyeoncheol a XUE, Xiang, 2020. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. Online. *Journal of Visualized Experiments*. Č. 160. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/60682>. [cit. 2024-02-26].

KISS, Dóra Judit a FERENCZY, György G., 2019. A detailed mechanism of the oxidative half-reaction of d-amino acid oxidase: another route for flavin oxidation. Online. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2019-08-28, roč. 17, č. 34, s. 7973-7984. ISSN 1477-0520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9OB00975B>. [cit. 2024-03-21].

KOLEV, Nikolay G.; RAMEY-BUTLER, Kiantra; CROSS, George A. M.; ULLU, Elisabetta a TSCHUDI, Christian, 2012. Developmental Progression to Infectivity in *Trypanosoma brucei* Triggered by an RNA-Binding Protein. Online. *Science*. 2012-12-07, roč. 338, č. 6112, s. 1352-1353. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1229641>. [cit. 2024-04-09].

KOPPENOL, W.H. a HIDER, R.H., 2019. Iron and redox cycling. Do's and don'ts. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. Roč. 133, č. 133, s. 3-10. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.022>. [cit. 2024-03-19].

KRAUTH-SIEGEL, R. Luise a COMINI, Marcelo A., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Roč. 1780, č. 11, s. 1236-1248. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>. [cit. 2024-04-06].

KUSSMAUL, Lothar a HIRST, Judy, 2006. The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006-05-16, roč. 103, č. 20, s. 7607-7612. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103>. [cit. 2024-03-24].

LENAZ, Giorgio, 2001. The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and Implications in Human Pathology. Online. *IUBMB Life*. Roč. 52, č. 3-5, s. 159-164. ISSN 1521-6543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15216540152845957>. [cit. 2024-03-24].

LI, Xinyuan; FANG, Pu; MAI, Jietang; CHOI, Eric T; WANG, Hong et al., 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. Online. *Journal of Hematology & Oncology*. Roč. 6, č. 1. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>. [cit. 2024-04-10].

MACH, Jan; POLIAK, Pavel; MATUŠKOVÁ, Anna; ŽÁRSKÝ, Vojtěch; JANATA, Jiří et al., 2013. An Advanced System of the Mitochondrial Processing Peptidase and Core Protein Family in *Trypanosoma brucei* and Multiple Origins of the Core I Subunit in Eukaryotes. Online. *Genome Biology and Evolution*. 2013-5-01, roč. 5, č. 5, s. 860-875. ISSN 1759-6653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/gbe/evt056>. [cit. 2024-04-05].

MULLER, Florian L.; ROBERTS, Arthur G.; BOWMAN, Michael K. a KRAMER, David M., 2003. Architecture of the Q_o Site of the Cytochrome bc₁ Complex Probed by Superoxide Production. Online. *Biochemistry*. 2003-06-01, roč. 42, č. 21, s. 6493-6499. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi0342160>. [cit. 2024-03-26].

NANDI, Ankita; YAN, Liang-Jun; JANA, Chandan Kumar a DAS, Nilanjana, 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019-11-11, s. 1-19. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>. [cit. 2024-03-28].

- PAK, Valeriy V.; EZERIŃA, Daria; LYUBLINSKAYA, Olga G.; PEDRE, Brandán; TYURIN-KUZMIN, Pyotr A. et al., 2020. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. Online. *Cell Metabolism*. Roč. 31, č. 3, s. 642-653.e6. ISSN 15504131. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.02.003>. [cit. 2024-03-31].
- POLLEGIONI, L.; PIUBELLI, L.; SACCHI, S.; PILONE, M. S. a MOLLA, G., 2007. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. Online. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Roč. 64, č. 11, s. 1373-1394. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6558-4>. [cit. 2024-03-22].
- PONTE-SUCRE, Alicia, 2016. An Overview of Trypanosoma brucei Infections: An Intense Host–Parasite Interaction. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2016-12-26, roč. 7, s. 1. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02126>. [cit. 2024-03-30].
- RAMPERSAD, Sephra N., 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. Online. *Sensors*. Roč. 12, č. 9, s. 12347-12360. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s120912347>. [cit. 2024-02-20].
- SAEEDI SARAVI, Seyed Soheil; EROGLU, Emrah; WALDECK-WEIERMAIR, Markus; SORRENTINO, Andrea; STEINHORN, Benjamin et al., 2020. Differential endothelial signaling responses elicited by chemogenetic H₂O₂ synthesis. Online. *Redox Biology*. Roč. 36. ISSN 22132317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101605>. [cit. 2024-03-30].
- SAHOO, Nirakar; HOSHI, Toshinori a HEINEMANN, Stefan H., 2014. Oxidative Modulation of Voltage-Gated Potassium Channels. Online. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014-08-20, roč. 21, č. 6, s. 933-952. ISSN 1523-0864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5614>. [cit. 2024-03-29].
- SIES, Helmut a JONES, Dean P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. Online. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020-07-15, roč. 21, č. 7, s. 363-383. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>. [cit. 2024-03-18].
- SIROVER, Michael A., 2018. Pleiotropic effects of moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in cancer progression, invasiveness, and metastases.

Online. *Cancer and Metastasis Reviews*. Roč. 37, č. 4, s. 665-676. ISSN 0167-7659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9764-7>. [cit. 2024-03-29].

SOMYAJIT, Kumar; GUPTA, Rajat; SEDLACKOVA, Hana; NEELSEN, Kai John; OCHS, Fena et al., 2017. Redox-sensitive alteration of replisome architecture safeguards genome integrity. Online. *Science*. 2017-11-10, roč. 358, č. 6364, s. 797-802. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aao3172>. [cit. 2024-03-29].

SOUSA, Joana S.; D'IMPRIMA, Edoardo a VONCK, Janet, 2018. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. Online. In: HARRIS, J. Robin a BOEKEMA, Egbert J. (ed.). *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*. Sv.87. Subcellular Biochemistry. Singapore: Springer Singapore, s. 167-227. ISBN 978-981-10-7757-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7. [cit. 2024-03-23].

TALEVA, Gergana; HUSOVÁ, Michaela; PANICUCCI, Brian; HIERRO-YAP, Carolina; PINEDA, Erika et al., 2023. Mitochondrion of the *Trypanosoma brucei* long slender bloodstream form is capable of ATP production by substrate-level phosphorylation. Online. *PLOS Pathogens*. 2023-10-11, roč. 19, č. 10. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011699>. [cit. 2024-04-10].

WALDECK-WEIERMAIR, Markus; YADAV, Shambhu; SPYROPOULOS, Fotios; KRÜGER, Christina; K. PANDEY, Arvind et al., 2021. Dissecting in vivo and in vitro redox responses using chemogenetics. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. S. 360-369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.006>. [cit. 2024-03-22].

WANG, Ying; BRANICKY, Robyn; NOË, Alycia a HEKIMI, Siegfried, 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. Online. *Journal of Cell Biology*. 2018-06-04, roč. 217, č. 6, s. 1915-1928. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>. [cit. 2024-03-27].

WINTERBOURN, Christine C.; KETTLE, Anthony J. a HAMPTON, Mark B., 2016. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. Online. *Annual Review of Biochemistry*. 2016-06-02, roč. 85, č. 1, s. 765-792. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>. [cit. 2024-03-28].

ZHANG, Lixiao; WANG, Xianwei; CUETO, Ramón; EFFI, Comfort; ZHANG, Yuling et al., 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. Online. *Redox Biology*. Roč. 26, s. 2. ISSN 22132317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>. [cit. 2024-03-19].

ZHAO, Ru-Zhou; JIANG, Shuai; ZHANG, Lin a YU, Zhi-Bin, 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Online. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019-05-08. ISSN 1107-3756. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>. [cit. 2024-04-10].

ZÍKOVÁ, Alena, 2022. Mitochondrial adaptations throughout the *Trypanosoma brucei* life cycle. Online. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Roč. 69, č. 6. ISSN 1066-5234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jeu.12911>. [cit. 2024-04-09].